

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Inhibitorische Wirkung endokriner Disruptoren auf die
humane Thyreoperoxidase

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Bacinski

aus Leipzig

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Köhrle
2. Prof. Dr. med. K.-M. Derwahl
3. Prof. Dr. med. G. Schönfelder

Datum der Promotion: 01.02.2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Die Schilddrüsenhormone	1
1.2. Die Thyreoperoxidase (TPO).....	1
1.2.1. Hormonsynthese	5
1.2.1.1. Voraussetzungen für die Hormonsynthese	5
1.2.1.2. Ablauf der Hormonsynthese	8
1.2.2. Klinische Bedeutung der TPO.....	13
1.2.3. Wirkungsmechanismen der Thyreostatika.....	13
1.2.4. Gewinnung eines TPO-Extraktes	16
1.3. Die endokrinen Disruptoren.....	17
1.3.1. Genistein.....	18
1.3.2. Myricetin.....	21
1.3.3. Xanthohumol.....	22
1.3.4. Apigenin	24
1.3.5. F21388.....	25
1.3.6. Benzophenon 2.....	26
2. Fragestellung	28
3. Material und Methoden	30
3.1. TPO-Extraktpräparation.....	30
3.2. Die endokrinen Disruptoren.....	31
3.3. TPO-Inhibierungsassay	32
3.4. Vergleich der TPO-Extrakte.....	33
3.5. TPO-Inaktivierungsassay	34
4. Ergebnisse	37
4.1. TPO-Inhibierungsassay.....	37

4.2. TPO-Inaktivierungsassay	41
4.2.1. Kontrollen	42
4.2.2. Inaktivierung.....	43
4.2.3. Effekt von KI.....	44
4.2.4. Effekt von H ₂ O ₂	46
4.3. Vergleich der verschiedenen TPO-Extrakte.....	47
5. Diskussion	50
5.1. TPO-Inhibierungsassay	50
5.1.1. Guaiacol-Oxidationsassay	50
5.1.2. Die Wirkung der endokrinen Disruptoren.....	52
5.2. TPO-Inaktivierungsassay	55
5.2.1. Methodische Überlegungen	55
5.2.2. Effekt von H ₂ O ₂	56
5.2.3. Die endokrinen Disruptoren	59
5.2.4. Effekt von KI.....	61
5.3. Die TPO-Extrakte	63
5.4. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Lebewesen.....	67
5.5. Fehlerbetrachtung	69
5.6. Welche Fragestellungen bleiben offen?.....	70
6. Zusammenfassung	72
7. Literaturverzeichnis.....	74
8. Erklärung.....	98
9. Lebenslauf.....	99
10. Publikationsliste	101
11. Danksagung	102

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Proteinstruktur der humanen TPO	3
Abb. 1-2: Struktur des Häms in der TPO.....	5
Abb. 1-3: Strukturformeln der häufigsten iodierten Aminosäuren im Thyreoglobulin	6
Abb. 1-4: Struktur der beiden verschiedenen Formen von Compound I	8
Abb. 1-5: Bildung der Compound I der TPO.....	9
Abb. 1-6: Reaktionszyklus von Peroxidasen	9
Abb. 1-7: Reaktionszyklus der TPO	10
Abb. 1-8: Mechanismus der Kopplungsreaktion der TPO	11
Abb. 1-9: Erleichterter Transfer von oxidierenden Äquivalenten von Compound I zu den hormonbildenden DIT-Resten im Thyreoglobulin	12
Abb. 1-10: Strukturformeln von (1) PTU, (2) MMI und (3) CBZ	14
Abb. 1-11: Wirkungsmechanismus von MMI	15
Abb. 1-12: Strukturformeln der verwendeten endokrinen Disruptoren und zum Vergleich von Thyroxin und 17 β -Estradiol.....	18
Abb. 4-1: Inhibierung der TPO im Guaiacol-Oxidationsassay durch Apigenin (A) und Xanthohumol (B)	37
Abb. 4-2: Inhibierung der TPO im Guaiacol-Oxidationsassay durch Genistein (A), F21388 (B) und Benzophenon 2 (C).....	38
Abb. 4-3: Inhibierung der TPO im Guaiacol-Oxidationsassay durch Myricetin	39
Abb. 4-4: UV-Spektrum zwischen 300 und 600 nm für verschiedene Konzentrationen von Myricetin im Vergleich zur Kontrolle ohne Myricetin	40
Abb. 4-5: TPO-Inaktivierung durch verschiedene Konzentrationen Genistein (G) in Anwesenheit von 10 μ M H ₂ O ₂ (H)	41
Abb. 4-6: Startwerte (zum Zeitpunkt 0 min, vor Zugabe von H ₂ O ₂) aller durchgeführten Inaktivierungsassays	42
Abb. 4-7: Kontrollen: Effekt der einzelnen im Inaktivierungsassay enthaltenen Stoffe auf die TPO.....	43
Abb. 4-8: Effekt von verschiedenen Konzentrationen KI auf 10 μ M Genistein, 10 μ M F21388 oder 300 nM Benzophenon 2	45

Abb. 4-9: Vergleich der sieben TPO-Extrakte (A: Zellextrakte, B: Schilddrüsenextrakte): Inhibierung der TPO im Guaiacol-Oxidationsassay durch verschiedene Konzentrationen von Benzophenon 2.....	49
Abb. 5-1: Mechanismus der Bildung des farbigen Guaiacol-Oxidationsproduktes katalysiert durch die TPO	51
Abb. 5-2: TPO-Inaktivierungsassay – Vergleich der Kurven der Originalversuche von Chang et al. mit denen dieser Arbeit	56
Abb. 5-3: Wirkungsmechanismus für die Hemmung der TPO durch Genistein	60

Tabellenverzeichnis

Tab. 4-1:	Inaktivierung der TPO durch Genistein (G), F21388 (F), Myricetin(MY) und Benzophenon 2 (B) in Anwesenheit von 10 μM H_2O_2 (H)	44
Tab. 4-2:	Zeitabhängiger Effekt von KI auf die Inaktivierung der TPO durch 10 μM Genistein, 10 μM F21388 oder 300 nM Benzophenon 2 (BP2)	46
Tab. 4-3:	Effekt von H_2O_2 auf die TPO allein und in Anwesenheit von 10 μM Genistein, F21388, Myricetin oder 300 nM Benzophenon 2 jeweils ohne und mit 200 μM KI.....	47
Tab. 4-4:	Vergleich der sieben TPO-Extrakte: Proteinkonzentration, im Inhibierungsassay eingesetzte Extrakt- und Proteinmenge und im Inhibierungsassay ohne endokrinen Disruptor erreichte spezifische TPO-Aktivität.....	48
Tab. 4-5:	Vergleich des Effekts von verschiedenen Konzentrationen Benzophenon 2 (B) auf die Zell- (TPO1-3) und Schilddrüsenextrakte (SD21-24).....	48
Tab. 5-1:	TPO-Aktivität verschiedener Extraktpräparationen.....	64

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ar	Aminosäurerest
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	Bovine serum albumin (Rinderalbumin)
BP 2	Benzophenon 2
CBZ	Carbimazol, 1-Methyl-2-mercapto-3-carethoxyimidazol
CCP	Complement Control Protein (Komplement-Kontrollprotein)
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CHO	Chinese Hamster Ovary (Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters)
DIT	3,5-Diiodtyrosin
DMSO	Dimethylsulfoxid (organisches Lösungsmittel)
ED	Endokriner Disruptor
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ER	Estrogen receptor (Östrogenrezeptor)
ERR	Estrogen receptor related receptor (Östrogenrezeptor-assoziiertes Rezeptor)
EU	Europäische Union
EURISKED	Multi-organic Risk Assessment of Selected Endocrine Disruptors (von der EU gefördertes Forschungsprojekt über den Einfluss einer Auswahl von Umweltchemikalien auf die Geschlechtsorgane und auf andere Hormonsysteme von Kleintieren)
Ex	Extrakt
F	F21388
Fa.	Firma
FRTL-5	Fischer-Rattenthreozytenzelllinie
FTC 133	Follicular thyroid carcinoma cell line (humane follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie)
FTC-238	Thyroid follicular carcinoma (humane follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie)
FTC-238/TPO	mit TPO transfizierte FTC-238-Zellen

G	Genistein
H	H ₂ O ₂
HDL	High Density Lipoprotein
Hep G2	Human hepatocellular carcinoma (menschliche Leberzellkarzinom-Zelllinie)
hNIS	humaner Natrium-Iodid-Symporter
h-TPO	humane Thyreoperoxidase
IC ₅₀	Konzentration für die halbmaximale Hemmung
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1)
KI	Kaliumiodid
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	luteinisierendes Hormon
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 (Brustadenokarzinom-Zelllinie)
MIT	3-Monoiodtyrosin
MMI	Methimazol, 1-Methyl-2-mercaptoimidazol
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MY	Myricetin
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PTU	6n-Propyl-2-thiouracil
REACH	Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (EU-Chemikalienverordnung, Verordnung (EG) Nr. 1907/2006)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RTFs	Reconstituted thyroid follicles (wiederhergestellte Schilddrüsenfollikel)
rTPO	Ratten-TPO
SD	Schilddrüse
T ₃	3',3,5-Triiodthyronin
T ₄	3',5',3,5-Tetraiodthyronin
Tg	Thyreoglobulin

TPO	Thyreoperoxidase
Trp	Tryptophan
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon, Thyreotropin
UV	Ultraviolettstrahlung
γ	Gravitationskonstante ($6,673 \cdot 10^{-11} \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$)

1. Einleitung

1.1. Die Schilddrüsenhormone

Schilddrüsenhormone spielen eine wichtige Rolle bei Entwicklung, Wachstum, Stoffwechsel und Funktion nahezu aller Körperorgane.

Ihre Wirkung entfalten sie hauptsächlich über die Bindung an die nukleären Schilddrüsenhormonrezeptoren und die anschließende transkriptionale Regulation von Zielgenen. Die verschiedenen Isoformen des Schilddrüsenhormonrezeptors konnten in nahezu allen Geweben nachgewiesen werden. Das unterstreicht die lebenswichtige Funktion der Schilddrüsenhormone in der Zellfunktion [Yen, 2001].

Hier steigern sie in den Mitochondrien die Stoffwechselaktivität und damit den Sauerstoffverbrauch [Wrutniak-Cabello et al., 2001].

Welchen wichtigen Effekt die Schilddrüsenhormone in der fetalen und frühen kindlichen Entwicklung haben, zeigen die Symptome von Kindern mit einer unbehandelten kongenitalen Hypothyreose. Betroffene Neugeborene zeigen aufgrund der zumindest partiellen Kompensation durch diaplazentar übertragene mütterliche Schilddrüsenhormone oft allenfalls unspezifische Symptome wie einen verlängerten Ikterus, Lethargie, Trinkschwierigkeiten, Umbilikalhernie, Makroglossie, eine erweiterte hintere Fontanelle, fehlende femorale Epiphysen, Obstipation und kalte oder marmorierte Haut [Rastogi & LaFranchi, 2010]. Bleibt die Hypothyreose unbehandelt, kommt es zum Vollbild des Kretinismus mit Kleinwuchs, schwerer mentaler Retardierung und neurologischen Defekten [Yen, 2001].

1.2. Die Thyreoperoxidase (TPO)

Das Schlüsselenzym bei der Synthese der Schilddrüsenhormone und damit ein wichtiger Angriffspunkt für endogene und exogene Substanzen, die einen Einfluss auf die oben beschriebenen Wirkungen der Schilddrüsenhormone haben, ist die Thyreoperoxidase (TPO).

Dabei handelt es sich um ein membrangebundenes, glykosyliertes Hämoprotein-Enzym, das sowohl die Iodierung von Tyrosylresten als auch die Kopplung von Iodotyrosylresten im Thyreoglobulin katalysiert, was zur Bildung von 3',5',3,5-

Tetraiodthyronin (T_4 , Thyroxin), 3',3,5-Triiodthyronin (T_3) und iodierten Tyrosinresten des Thyreoglobulins führt [Taurog, 2000].

Das Gen für die humane TPO liegt auf Chromosom 2 [Kimura et al., 1987], besteht aus 17 Exons [Kimura et al., 1989a] und kodiert ein aus 933 Aminosäureresten bestehendes Protein – die TPO-1 [Kimura et al., 1987]. Es wurden mehrere Isoformen der cDNA der humanen TPO (die Originalform wird als TPO-1 bezeichnet) beschrieben, die durch alternatives Splicen des TPO-Gens entstehen. Die daraus entstehenden Proteine werden entweder an der Zelloberfläche exprimiert und zeigen normale enzymatische Aktivität wie TPO-3 (TPO Zanelli), bei der Exon 16 fehlt [Niccoli-Sire et al., 2001] und TPO-4, bei der Exon 14 fehlt [Ferrand et al., 2003] oder sie erreichen die Zelloberfläche nicht und weisen keine enzymatische Aktivität auf wie TPO-2, wo Exon 10 fehlt [Niccoli et al., 1997] und TPO-5, wo Exon 8 fehlt [Ferrand et al., 2003]. Außerdem wurden inzwischen Formen der TPO gefunden, denen mehrere Exons fehlen, so zum Beispiel TPO-2/3 (Exon 10 und 16 fehlen), TPO-2/4 (Exon 10 und 14 fehlen) und TPO-6 (Exon 10, 12, 13, 14 und 16 fehlen) [Ferrand et al., 2003].

Die TPO wird an den Polysomen synthetisiert und in das endoplasmatische Retikulum abgegeben [Ruf & Carayon, 2006], wo die Faltung, ein erster Glykosylierungsprozess [Fayadat et al., 1998] und die Assoziation mit dem Häm [Fayadat et al., 1999] stattfinden. Falsch gefaltete TPO-Moleküle werden entweder durch zytosolische Proteosomen oder durch membrangebundene Proteasen im endoplasmatischen Retikulum abgebaut [Fayadat et al., 2000]. Die korrekt gefalteten Moleküle werden durch exozytotische Vesikel zum Golgi-Apparat gebracht, wo die abschließende Glykosylierung abläuft [Ruf & Carayon, 2006, Varki, 1998]. Von dort aus wird die TPO in die apikale Thyreozytenmembran transportiert [Ruf & Carayon, 2006], wo sie ihre katalytische Seite in Richtung Follikellumen exponiert [Bresson et al., 2005]. So erreichten in einem Modellsystem mit CHO-Zellen nur etwa 2% der synthetisierten TPO-Moleküle die Zelloberfläche [Fayadat et al., 1998]. Dort kann man etwa 4% der in einer Zelle befindlichen TPO-Moleküle nachweisen, der Rest befindet sich intrazellulär, bevorzugt im perinukleären Teil des endoplasmatischen Retikulums [Penel et al., 1998].

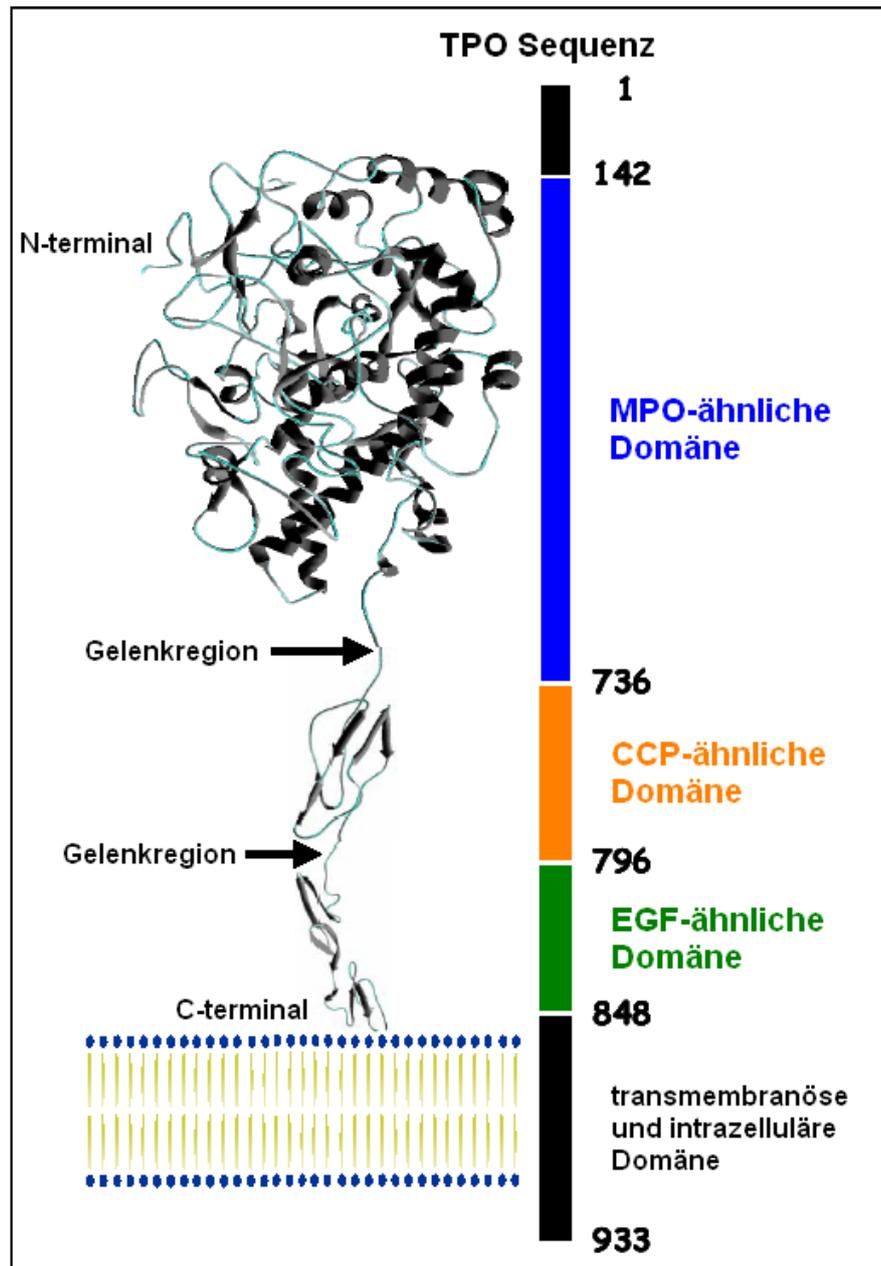


Abb. 1-1: Proteinstruktur der humanen TPO (modifiziert nach Bresson et al., 2005)

Die menschliche TPO ist ein aus 933 Aminosäuren bestehendes integrales Membranprotein der apikalen Schilddrüsenepithelzelle. Sie besteht aus einer großen extrazytoplasmatischen Region, die in das Follikellumen ragt, einer kurzen, aus 24 Aminosäuren bestehenden transmembranösen Region und einem aus 61 Aminosäuren bestehenden zytoplasmatischen Rest. Der extrazelluläre Bereich besteht aus 848 Aminosäuren und enthält fünf potentielle Glykosylierungsstellen [Bresson et al., 2005], von denen aber nur vier tatsächlich glykosyliert werden [Fayadat et al., 1998]. In verschiedenen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass der extrazelluläre Teil der

menschlichen TPO aus drei verschiedenen Domänen besteht. Vom N-terminalen Ende aus reihen sich eine Myeloperoxidase (MPO)-ähnliche Region, eine Complement-Control-Protein (CCP)-ähnliche Region und eine Epidermal-Growth-Factor (EGF)-ähnliche Region aneinander (Abb. 1-1) [Hobby et al., 2000].

Die dreidimensionale Struktur der TPO bleibt bisher noch unbekannt [Ruf & Carayon, 2006], obwohl es bereits mehrmals gelang, Kristalle aus TPO zu gewinnen, die sich aber als nicht ausreichend für dreidimensionale Strukturanalysen erwiesen [Gardas et al., 1997, Hendry et al., 1999].

Allerdings kennt man die Kristallstruktur der Myeloperoxidase (MPO) [Fenna et al., 1995, Zeng & Fenna, 1992], die wie die TPO, die eosinophile Peroxidase, die Laktoperoxidase und die Speichelperoxidase zu einer Genfamilie von Säugetier-Peroxidasen gehört [Taurog, 1999]. Die hohe Homologie zwischen MPO und TPO ermöglichte eine Vorhersage der Sekundärstruktur und der Anordnung der Domänen der TPO [Banga et al., 1990], die hauptsächlich aus α -Helices und einigen kleinen β -Faltblattstrukturen besteht (Abb. 1-1).

Von der MPO als Modell ausgehend gibt es Hinweise dafür, dass es sich bei der an der Zelloberfläche exprimierten TPO um ein durch Disulfidbrücken verbundenes Dimer handelt [Baker et al., 1994].

Um enzymatisch aktiv zu sein, benötigt die TPO die Assoziation mit einem Häm [Krinsky & Alexander, 1971]. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein Häm I (wie in der Laktoperoxidase, Abb. 1-2), das kovalent über Esterbindungen zwischen zwei Hydroxymethylgruppen des Häms und einem Aspartat- (238) und einem Glutamatrest (399) der TPO an das Protein gebunden ist [Rae & Goff, 1998, Ruf & Carayon, 2006]. Diese kovalente Bindung findet entweder bereits im endoplasmatischen Retikulum statt oder später in einem H_2O_2 -abhängigen autokatalytischen Prozess an der Zelloberfläche [Fayadat et al., 1999].

Weitere wichtige Aminosäurereste der TPO sind der Histidinrest 494, der den axialen Liganden für das Eisen des Häms bildet, der Histidinrest 239 und der Argininrest 396, die beide am katalytischen Mechanismus zur Bildung von Compound I, der durch Oxidation aktivierten Form der TPO (Beschreibung des genauen Mechanismus in Kapitel 1.2.1.2. Ablauf der Hormonsynthese), mitwirken [Taurog & Wall, 1998].

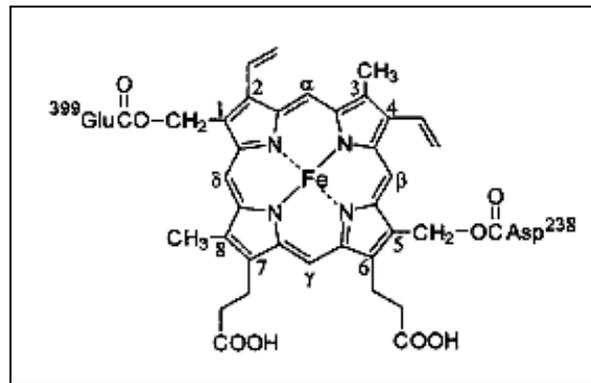


Abb. 1-2: Struktur des Häms in der TPO (aus Rae & Goff, 1998, modifiziert nach Ruf & Carayon, 2006): Bindung durch Esterbindungen an Aspartat-238 und Glutamat-399

1.2.1. Hormonsynthese

1.2.1.1. Voraussetzungen für die Hormonsynthese

Die Schilddrüsenperoxidase (TPO) katalysiert in der Schilddrüse gleichzeitig zwei sehr verschiedene Reaktionstypen, die an der apikalen Thyreozytenmembran im Kolloid des Follikels stattfinden: die Iodierung von im Thyreoglobulin gebundenen Tyrosinresten zu 3-Mono- (MIT) und 3,5-Diiodtyrosin (DIT) und die Kopplung der entstehenden Iodotyrosinreste, was zur Bildung von T_3 und T_4 führt [Ruf & Carayon, 2006, Taurog, 2000]. Für diese Reaktionen kommt es wahrscheinlich zur Dimerbildung der TPO [McDonald & Pearce, 2009] und es ist die Anwesenheit von H_2O_2 , Iodid und Thyreoglobulin (Tg) notwendig [Ruf & Carayon, 2006].

H_2O_2 wird durch eine kalziumabhängige NADPH-Oxidase [Carvalho et al., 1996] an der apikalen Plasmamembran der Schilddrüsenepithelzelle durch die Oxidation von NADPH produziert [De Deken et al., 2000]. Diese ist sowohl unter dem Namen Schilddrüsenoxidase (Thox = thyroid oxidase) [De Deken et al., 2000] als auch als Dualoxidase (Duox) [El Hassani et al., 2005] bekannt.

Das zur NADPH-Oxidasefamilie gehörende Enzym existiert in 2 Formen (Duox1 und Duox2), die in 83% der Proteinsequenz übereinstimmen, und ist gemeinsam mit der TPO am apikalen Pol der Schilddrüsenzelle lokalisiert [Song et al., 2010]. Diese enge räumliche Beziehung von TPO und Duox, die auch als Thyroxisom bezeichnet wird,

bewirkt, dass das entstehende und für die Zellen potentiell schädliche H_2O_2 direkt von der TPO verbraucht wird [Song et al., 2007].

Unter physiologischen Bedingungen scheint die Bildung von H_2O_2 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Schilddrüsenhormonsynthese zu sein [Corvilain et al., 1991].

Iodid wird an der basolateralen Membran der Schilddrüsenepithelzelle [Chambard et al., 1983] aus dem Serum in die Zelle aufgenommen. Dies geschieht mittels sekundär aktivem Transport über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS), der gleichzeitig zwei Natriumionen und ein Iodidion in die Zelle transportiert [Eskandari et al., 1997]. Die treibende Kraft für diesen Symport ist der Natriumgradient (hohe Natriumkonzentration im Blut, niedrige Natriumkonzentration in der Zelle), der durch die Natrium-Kalium-ATPase aufgebaut wird [Wolff & Halmi, 1963]. Dadurch ist die Schilddrüsenepithelzelle in der Lage Iodid im Vergleich zum Serum 20 bis 40fach zu konzentrieren [Dohan et al., 2003].

Das intrazelluläre Iodid wird in einem als Iodid-Ausstrom bezeichneten Prozess passiv aus dem Zytoplasma über die apikale Zellmembran in das Follikellumen transportiert [Dohan et al., 2003], wo die Synthese der Schilddrüsenhormone stattfindet. Als beteiligte Transporter werden zum einen Pendrin (ein Cl^-/I^- -Transporter) [Yoshida et al., 2004] und zum anderen der Chloridkanal CIC-5 [Van den Hove et al., 2006] diskutiert.

Thyreoglobulin ist ein hochmolekulares Glykoprotein (660 kDa, 10% Kohlenhydratanteil), das aus zwei identischen Untereinheiten besteht [Dunn & Dunn, 2000] und den größten Teil des Iods in der Schilddrüse enthält [Taurog, 2000]. Ein Großteil des Thyreoglobulins befindet sich in löslicher Form im Schilddrüsenfollikellumen [Taurog, 2000], ein Teil liegt aber auch als unlösliche, über Disulfidbrücken und andere kovalente Bindungen quervernetzte Form vor [Herzog et al., 1992].

Thyreoglobulin hat keine ungewöhnliche Proteinstruktur, es enthält aber als einziges Körperprotein iodierter Aminosäuren (Abb. 1-3). Diese sind die Vorläufer der aktiven Hormone T_3 und T_4 [Taurog, 2000]. Der Iodidgehalt von Thyreoglobulin variiert zwischen 0,1% und 1,0% des Gewichts, was circa 5 bis 50 Iodatomen pro Thyreoglobulin-Dimer entspricht [Dunn & Dunn, 2001].

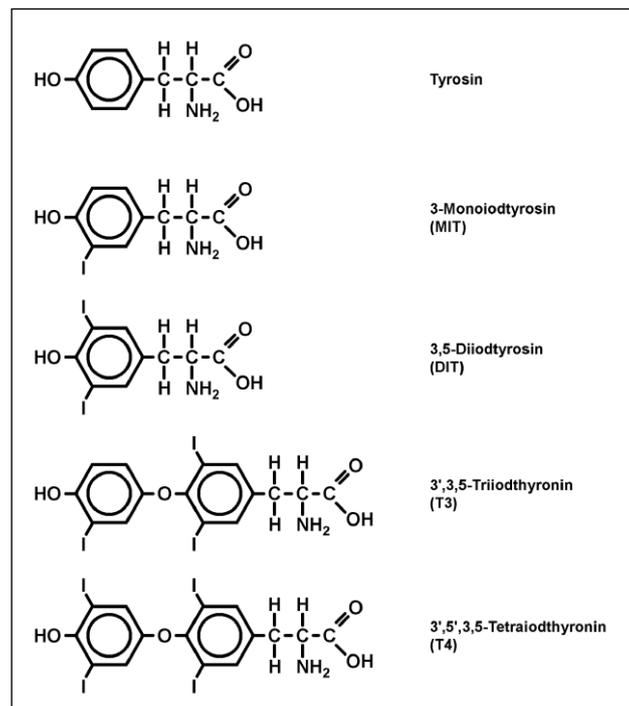


Abb. 1-3: Strukturformeln der häufigsten iodierten Aminosäuren im Thyreoglobulin (modifiziert nach Taurog, 2000)

Insgesamt enthält das menschliche Thyreoglobulin bei normalem Iodangebot und normaler Schilddrüsenfunktion 132 Tyrosylreste pro 660 kDa-Dimer und bei einem Iodgehalt von 0,5% durchschnittlich 26 Atome Iod [Dunn & Dunn, 2000], die sich auf durchschnittlich 5 MIT-Reste, 4,5 DIT-Reste, 2,5 T₄-Reste und 0,7 T₃-Reste verteilen [Dunn & Dunn, 2001]. Der geringe Iodgehalt lässt darauf schließen, dass unter physiologischen Bedingungen nur bestimmte Tyrosylreste der Iodierung zugänglich sind [Taurog, 1996]. Es hat sich gezeigt, dass die Tyrosylreste, die zuerst zu MIT und DIT iodiert werden auch bevorzugt zu T₄ umgesetzt werden, was eine effektive Hormonbildung besonders bei geringen Iodidkonzentrationen ermöglicht [Lamas et al., 1974].

Bei der Kopplung reagieren entweder zwei im Thyreoglobulin gebundene DIT-Reste miteinander oder es reagiert ein DIT-Rest mit einem MIT-Rest, wobei T₄ beziehungsweise T₃ entstehen. Der Iodotyrosylrest, der den äußeren phenolischen Ring liefert, wird dabei als Donator bezeichnet, während der Iodotyrosylrest, der den inneren Ring liefert, Akzeptor heißt [Taurog, 1996]. Es wurden bereits einige Akzeptor- und Donatorstellen im Thyreoglobulin identifiziert; so dient beispielsweise der Tyrosylrest in Position 5 als Akzeptor und der Tyrosylrest 130 als dazugehöriger Donator [Marriq et al., 1989].

1.2.1.2. Ablauf der Hormonsynthese

Der erste Schritt in der Reaktion aller Häm-Peroxidasen, und damit auch der TPO, ist deren Oxidation durch die Übertragung von zwei Elektronen auf H_2O_2 , was zur Bildung von Wasser und Compound I der Peroxidase führt, die somit zwei Oxidationsstufen über dem nativen Enzym liegt. Compound I kann in zwei verschiedenen Formen existieren (Abb. 1-4). In der einen Form wird ein Elektron vom Eisen, das eine Oxoferrylgruppe ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) formt, abgegeben, das zweite Elektron stammt vom Porphyrinring. Dabei entsteht die Oxoferryl-Porphyrin Π -Kationradikalform von Compound I. Bei der zweiten Form stammt das erste Elektron ebenfalls vom Eisen, das zweite Elektron wird von einem nahen Tryptophan- oder Tyrosinrest im Apoprotein abgezogen – es entsteht die Proteinradikalform von Compound I [Taurog et al., 1996].

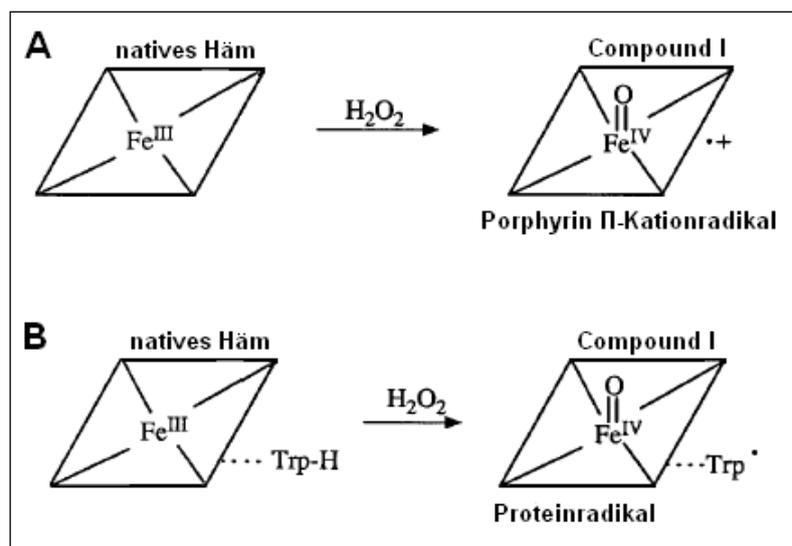


Abb. 1-4: Struktur der beiden verschiedenen Formen von Compound I (modifiziert nach Taurog et al., 1996).

- (A) Oxoferryl-Porphyrin Π -Kationradikalform.
- (B) Oxoferryl-Proteinradikalform, bei der ein Elektron von einem nahen Tryptophan- (Trp) oder Tyrosinrest abgezogen wird.

Die Bildung von Compound I bei der TPO beginnt mit deren Oxidation durch Übertragung von zwei Elektronen auf H_2O_2 , wobei die Oxoferryl-Porphyrin Π -Kationradikalform von Compound I entsteht. Diese Form ist sehr instabil und in Abwesenheit eines geeigneten oxidierbaren Substrates isomerisiert sie spontan zur Proteinradikalform von Compound I, bei der ein oxidierendes Äquivalent zu einem

Aminosäurerest im Apoprotein (wahrscheinlich ein Tryptophan- oder Tyrosinrest) verlagert wird (Abb. 1-5) [Taurog et al., 1996].

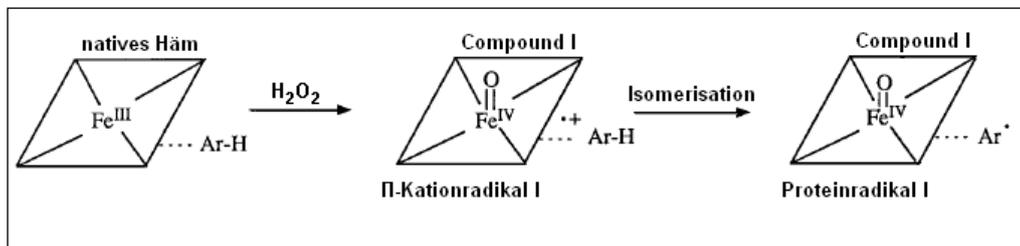


Abb. 1-5: Bildung der Compound I der TPO (modifiziert nach Taurog et al., 1996): Ar = Aminosäurerest, weitere Erklärung im Text

Die Pi-Kationradikalform von Compound I kann ein organisches Substrat durch Aufnahme eines Elektrons oxidieren. Dabei entsteht ein Substratradikal (•AH) und Compound II, die eine Oxidationsstufe über dem nativen Enzym liegt und eine Oxoferrylgruppe enthält, die mit einem normalen (zweifach negativ geladenen) Porphyrinliganden koordiniert ist. Durch eine zweite Aufnahme eines Elektrons wird Compound II zum nativen Enzym (Fe^{III}) reduziert, wobei ein Substrat oxidiert wird (Abb. 1-6) [Haem peroxidases, 2006].

Die Pi-Kationradikalform von Compound I kann außerdem durch die Aufnahme von zwei Elektronen direkt zum nativen Enzym reduziert werden [Ohtaki et al., 1981].

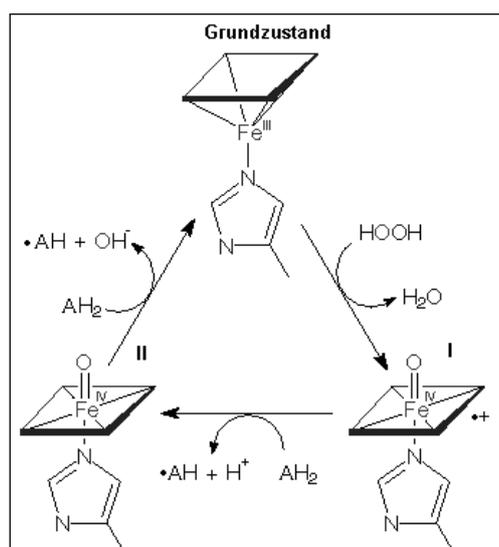


Abb. 1-6: Reaktionszyklus von Peroxidasen: I = Compound I, II = Compound II (modifiziert nach Haem peroxidases, 2006)

Zum Ablauf der durch die TPO katalysierten Reaktionen gibt es verschiedene Theorien. Taurog, Dorris und Doerge erstellten 1996 [Taurog et al., 1996] folgendes Schema:

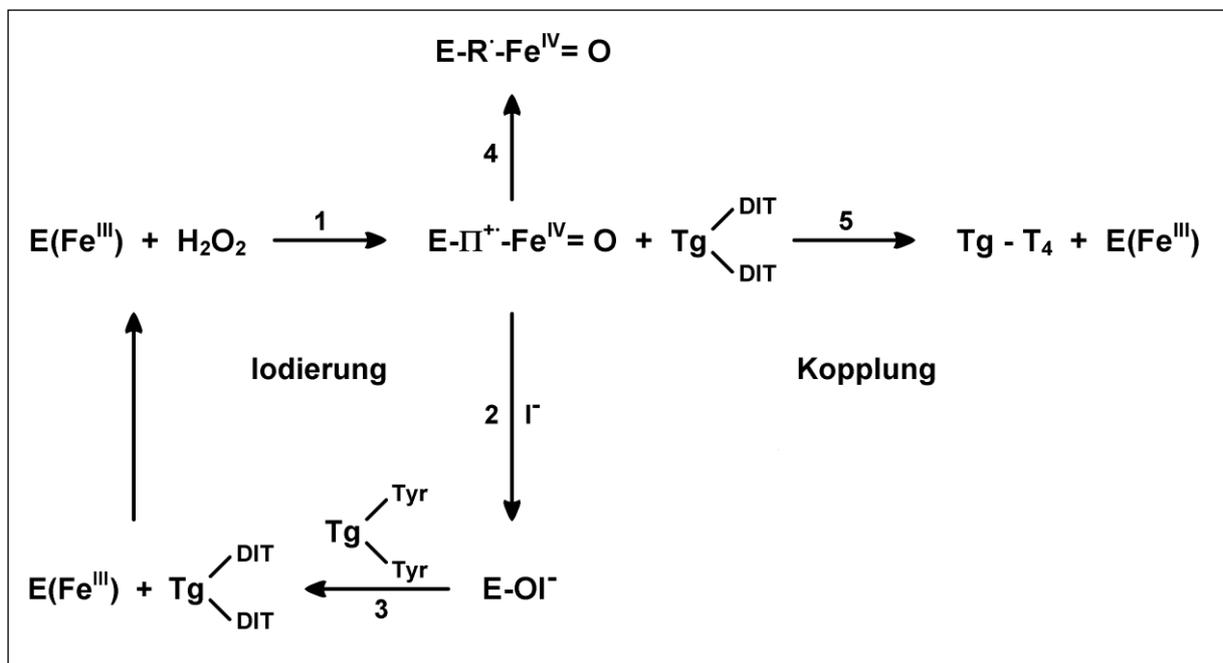


Abb. 1-7: Reaktionszyklus der TPO (modifiziert nach Taurog et al., 1996): Erklärung im Text

Der erste Schritt (Reaktion 1) ist die Oxidation der nativen TPO (Fe^{III}) durch H_2O_2 zur Π -Kationradikalform von Compound I ($E - \Pi^+ - Fe^{IV}=O$). Ist kein reduzierendes Substrat vorhanden, isomerisiert diese Form des Enzyms sehr schnell zur Proteinradikalform von Compound I ($E - R\cdot - Fe^{IV}=O$) (Reaktion 4). In Anwesenheit von Iodid und Thyreoglobulin wird das Iodid von der Π -Kationradikalform von Compound I schnell zu einer iodierenden Spezies oxidiert (Reaktion 2), die dann die im Thyreoglobulin gebundenen Tyrosylreste iodiert (Reaktion 3) [Taurog et al., 1996]. Bei der Oxidation von Iodid handelt es sich um eine zwei-Elektronen-Reaktion [Ohtaki et al., 1981], die wahrscheinlich zur Bildung eines enzymgebundenen Hypoiodid ($E-OI^-$) als iodierende Spezies [Sun & Dunford, 1993] und zur Regeneration des nativen Enzyms führt. Der Iodierungszyklus (Reaktion 2 und 3) läuft wesentlich schneller ab als die Isomerisierung (Reaktion 4), so dass unter physiologischen Bedingungen, wo kontinuierlich Iodid in die Schilddrüse aufgenommen wird und für Reaktionen bereit steht, die Bildung der Proteinradikalform von Compound I verhindert wird.

Die Kopplungsreaktion (Reaktion 5), die simultan zur Iodierung abläuft, muss demnach auch durch die Π -Kationradikalform von Compound I katalysiert werden. Allerdings ist auch die Proteinradikalform von Compound I in der Lage, eine Kopplungsreaktion zu katalysieren [Virion et al., 1985]. Dies spielt eventuell eine Rolle in Situationen mit großem Iodmangel beziehungsweise in Testsystemen ohne Iod, wenn es zur schnellen Isomerisierung der Π -Kationradikalform zur Proteinradikalform von Compound I kommt [Taurog et al., 1996].

Bei der Kopplungsreaktion handelt es sich wahrscheinlich um einen Radikalmechanismus [Taurog et al., 1994a, Doerge et al., 1994], der nach folgendem Schema abläuft:

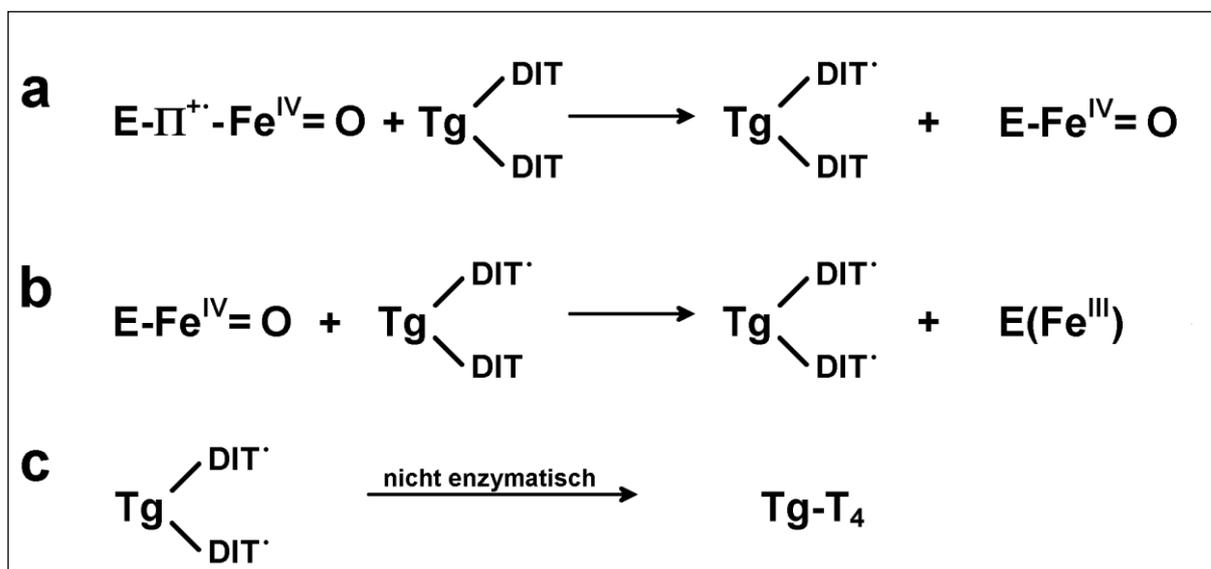


Abb. 1-8: Mechanismus der Kopplungsreaktion der TPO (modifiziert nach Taurog et al., 1996): Erklärung im Text

Reaktion a und b zeigen die schrittweise ein-Elektronen Oxidation von an Thyreoglobulin gebundenen DIT-Resten, die durch die Π -Kationradikalform von Compound I ($E-II^{+\cdot}-Fe^{IV}=O$) beziehungsweise durch Compound II ($E-Fe^{IV}$) katalysiert wird. Dabei entstehen die Radikalformen der an Thyreoglobulin gebundenen DIT-beziehungsweise MIT-Reste, die anschließend miteinander reagieren (Reaktion c). Dabei kommt es zur zwischenzeitlichen Bildung eines instabilen Chinolethers, der sich schnell zu einem Iodothyronin umlagert. Bei der Bildung von T_4 stammt der äußere Ring von einem DIT-Rest, bei der T_3 -Bildung von einem MIT-Rest [Taurog et al., 1996]. In

beiden Fällen bleibt vom Iodotyrosin, das den äußeren Ring liefert, in der Peptidkette des Thyreoglobulins ein Dehydroalanin übrig [Gavaret et al., 1980].

Hohe Iodidkonzentrationen hemmen die Bildung von T_4 (nicht von T_3), DIT verhindert diesen Effekt und stimuliert die Kopplungsreaktion [Taurog et al., 1996].

Der hemmende Effekt von Iodid kann wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass Iodid und DIT-Reste um die Π -Kationradikalform von Compound I konkurrieren. Dieser Mechanismus könnte in der autoregulatorischen Wirkung von Iodid in der Schilddrüsenfunktion eine Rolle spielen. Außerdem könnte es einen Cofaktor beim positiven Effekt von hohen Dosen Iod in der Behandlung von Morbus Basedow darstellen, der bisher ausschließlich auf eine Hemmung der Hormonfreisetzung aus der Schilddrüse zurückgeführt wurde [Taurog et al., 1996].

Der stimulierende Effekt von geringen Mengen freiem DIT auf die Kopplungsreaktion lässt sich dadurch erklären, dass freies DIT den Transfer von oxidierenden Äquivalenten von Compound I beziehungsweise Compound II zu den hormonbildenden DIT-Resten im Thyreoglobulin erleichtert, indem es zwischen unoxidierter und einfach oxidierter Form wechselt (Abb. 1-9) [Taurog, 1996].

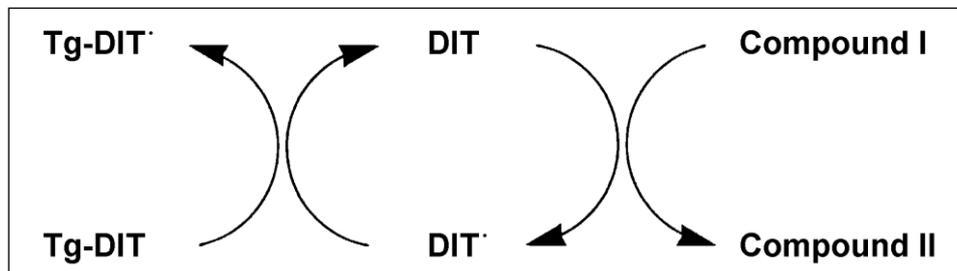


Abb. 1-9: Erleichterter Transfer von oxidierenden Äquivalenten von Compound I zu den hormonbildenden DIT-Resten im Thyreoglobulin (aus Taurog, 1996)

Andere Theorien gehen davon aus, dass es sich bei der Iodierung um einen Radikalmechanismus handelt, bei dem Iodid und Tyrosin an die TPO Compound I gebunden und jeweils durch eine ein-Elektronen-Oxidation zu den entsprechenden Radikalen umgesetzt werden, die dann miteinander reagieren [Ruf & Carayon, 2006]. Außerdem gibt es Hinweise, dass es sich bei der iodierenden Spezies um I^+ handeln könnte, das durch eine zwei-Elektronen-Oxidation durch Compound I aus I^- entsteht [Ohtaki et al., 1981].

Für die Kopplungsreaktion ist der Radikalmechanismus weitestgehend anerkannt [Taurog, 2000, Ruf & Carayon, 2006], obwohl zwischenzeitlich auch die Theorie von einem ionischen Mechanismus diskutiert wurde [Gavaret et al., 1981].

1.2.2. Klinische Bedeutung der TPO

Die TPO stellt bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen ein Hauptziel für das Immunsystem dar [Überblick in McLachlan & Rapoport, 2007], was zu hohen Titern TPO-spezifischer Autoantikörper in den Seren von Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis oder Morbus Basedow führt. In einem Versuch mit 303 Patienten mit verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen fanden sich bei 88% der Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis und bei 53% der Patienten mit Morbus Basedow Autoantikörper gegen die TPO [Engler et al., 1994].

Des Weiteren kann eine Mutation im TPO-Gen die Ursache einer kongenitalen Hypothyreose sein [Rodrigues et al., 2005]. Diese kann, wenn sie nicht im Neugeborenen-Screening erkannt und durch L-Thyroxin-Substitution behandelt wird, zu schweren Entwicklungsstörungen führen [Park & Chatterjee, 2005]. Da bereits Fälle beschrieben wurden, in denen es bei Patienten mit Mutationen im TPO-Gen zur Entstehung von Schilddrüsenkrebs kam [Medeiros-Neto et al., 1998], müssen diese Patienten auch diesbezüglich überwacht werden.

Außerdem ist die TPO der Angriffspunkt der in der Behandlung der Hyperthyreose weit verbreiteten Medikamente Propylthiouracil, Methimazol und Carbimazol (siehe Kapitel 1.2.3.).

1.2.3. Wirkungsmechanismen der Thyreostatika

Die meistverwendeten Thyreostatika sind die Thioharnstoffderivate Propylthiouracil (PTU), Methimazol (1-Methyl-2-mercaptoimidazol, MMI) und Carbimazol (1-Methyl-2-mercapto-3-carbethoxyimidazol, CBZ) [Taurog, 2000] (Abb. 1-10), wobei Carbimazol in vivo sehr schnell zu Methimazol umgewandelt wird [Nakashima & Taurog, 1979]. Für alle drei Stoffe konnte nachgewiesen werden, dass sie in vitro die von der TPO

katalysierten Reaktionen der Iodierung von Thyreoglobulin und der Guaiacoloxidation hemmen [Taurog, 1976].

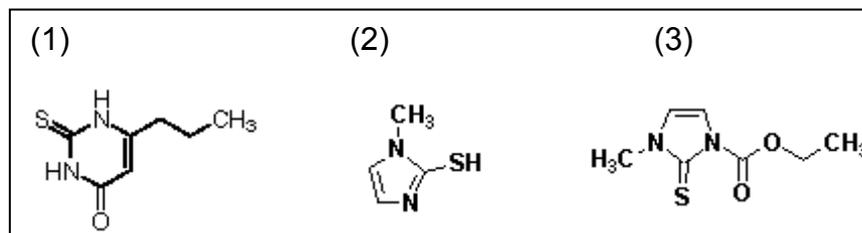


Abb. 1-10: Strukturformeln von (1) PTU, (2) MMI und (3) CBZ

In verschiedenen Versuchen *in vitro* konnte gezeigt werden, dass es bei der Iodierung in Abhängigkeit vom Verhältnis der Iodidkonzentration zur Hemmstoffkonzentration entweder zur reversiblen Hemmung oder zur irreversiblen Inaktivierung der TPO kommt [Taurog, 1976]. Der dahinter vermutete Mechanismus ist für MMI in Abb. 1-11 dargestellt. Dabei wird bei der irreversiblen Hemmung die TPO wahrscheinlich durch kovalente Bindung des oxidierten MMI an das Häm schnell komplett inaktiviert (Reaktion 2), wenn im Verhältnis viel MMI und wenig Iodid vorhanden ist. Bei einem Verhältnis von wenig MMI zu viel Iodid entsteht bevorzugt die iodierende TPO-Spezies $[EOI]^-$ (Reaktion 3) und es kommt zur reversiblen Hemmung. Diese beruht auf der Konkurrenz zwischen MMI und den Tyrosylresten um die iodierende TPO-Form $[EOI]^-$. Die MMI-Oxidation über Disulfid zum Sulfit oder zum Sulfat (Reaktion 5) ist dabei die bevorzugt ablaufende Reaktion und solange MMI vorhanden ist, katalysiert die TPO statt der Iodierung (Reaktion 6) die MMI-Oxidation. Dabei wirkt MMI als kompetitiver Hemmstoff der Iodierung, wobei die TPO selbst nicht gehemmt wird. Ist das MMI größtenteils abgebaut, beginnt die Iodierung wieder abzulaufen. Der dargestellte Mechanismus gilt mit geringen Abweichungen auch für PTU [Taurog, 2000].

Diese durch *in vitro*-Experimente gewonnenen Ergebnisse wurden durch Versuche an Ratten untermauert. Es konnte gezeigt werden, dass der intrathyroidale Metabolismus von PTU und MMI bei Iodmangel und hohen Dosen der Hemmstoffe deutlich reduziert ist und dass die Iodierungshemmung bei hohen Hemmstoffdosen mit einem relativ geringen Hemmstoffmetabolismus verbunden ist, während es bei niedrigen Hemmstoffdosen zu einem ausgeprägten Metabolismus kommt [Nakashima et al., 1978]. Auch sind *in vivo* beim Abbau von PTU die gleichen Metabolite nachweisbar wie *in vitro* [Taurog & Dorris, 1989]. Sowohl für PTU [Taurog & Dorris, 1989] als auch für

MMI [Taurog et al., 1989] gibt es Hinweise, dass es in vivo nicht zu einer irreversiblen sondern lediglich zu einer reversiblen Hemmung der TPO kommt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Akkumulation von PTU und MMI in der Schilddrüse [Nakashima et al., 1978] essentiell für ihre thyreostatische Wirkung ist [Taurog et al., 1995, Taurog et al., 1994b].

Neben den beschriebenen Effekten von PTU und MMI auf die Iodierungsfunktion der TPO gibt es Hinweise darauf, dass diese Stoffe unabhängig davon unter bestimmten Bedingungen in vitro auch die Kopplungsfunktion hemmen [Engler et al., 1982].

In stabil mit TPO transfizierten CHO-Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl PTU als auch MMI die Bildung von TPO-Dimeren hemmen ohne einen Effekt auf die Menge der TPO-Monomere zu haben. Ob sich über diesen Effekt auf die TPO-Struktur ein Teil der thyreostatischen Wirkung beider Substanzen in vivo erklären lässt, ist noch offen, da in der beschriebenen Studie keine Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte [McDonald & Pearce, 2009].

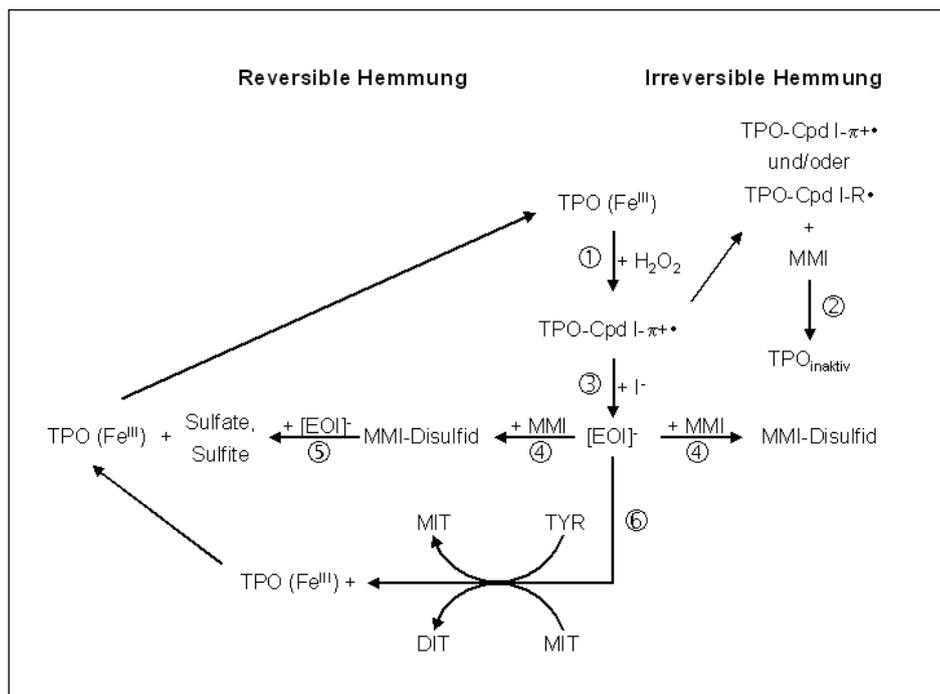


Abb. 1-11: Wirkungsmechanismus von MMI (modifiziert nach Taurog, 2000):
 TPO (Fe^{III}) = native TPO,
 TPO-Cpd I-π⁺• = π-Kationradikalform der Compound I
 TPO-Cpd I-R• = Proteinradikalform der Compound I
 [EOI]⁻ = iodierende TPO-Spezies,
 weitere Erklärung im Text

1.2.4. Gewinnung eines TPO-Extraktes

Zur Gewinnung der TPO gibt es verschiedene Möglichkeiten. Anfangs wurde die Aufreinigung der TPO durch die Behandlung der Membranfraktion von beispielsweise Schweineschilddrüsen mit Trypsin und verschiedenen Detergenzien erreicht [zum Beispiel Coval & Taurog, 1967, Ohtaki et al., 1982]. Dabei entsteht ein großes, lösliches TPO-Fragment mit hoher katalytischer Aktivität [Yokoyama & Taurog, 1988]. Solche Präparationen aus Schweineschilddrüsen wurden in Modellsystemen zum Studium des Iodierungs- und Kopplungsmechanismus der TPO verwendet [Taurog et al., 1996].

Später wurde die durch Detergenzien freigesetzte native TPO mittels Immunaффinitätschromatographie, bei der monoklonale Antikörper gegen die TPO zum Einsatz kommen, aufgereinigt [Gardas et al., 1997, Ohtaki et al., 1986]. Diese Methode zeichnet sich durch einen geringeren Zeitaufwand und einen größeren Ertrag aus; allerdings zeigt die so gewonnene TPO eine geringere Reinheit und eine reduzierte enzymatische Aktivität im Vergleich zur Aufreinigung mit Trypsin [Ohtaki et al., 1986].

Das molekulare Klonen der humanen TPO (h-TPO) ermöglichte es später, rekombinante h-TPO zu erzeugen. Dies wurde in verschiedenen Systemen erreicht, wobei unter anderem Chinesische Hamster Ovar Zellen (CHO Zellen) [Guo et al., 1998], Hep G2 Zellen [Kimura et al., 1989b] und High-5 Insektenzellen [Gardas et al., 1999] verwendet wurden. Durch Transfektion mit einer gekürzten TPO cDNA konnte in CHO Zellen außerdem die Sekretion einer biologisch aktiven TPO generiert werden [Foti et al., 1990]. Alle beschriebenen rekombinanten h-TPO-Präparationen waren hochgradig immunreaktiv mit mikrosomalen Antikörpern, aber einige zeigten keine oder nur eine geringe enzymatische Aktivität [Guo et al., 1998, Gardas et al., 1999]. Aus diesem Grund galt die rekombinante humane TPO bisher als nützlicher für immunologische als für katalytische Studien [Taurog, 2000].

1.3. Die endokrinen Disruptoren

Endokrine Disruptoren sind Stoffe, die die Entwicklung oder die Funktion des endokrinen Systems stören oder verändern. Von einem Teil dieser Stoffe weiß man, dass sie als Agonisten oder als Antagonisten an den Hormonrezeptoren wirken. Andere stören die Produktion, den Transport, den Stoffwechsel oder die Ausscheidung von natürlichen Hormonen. Gemeinsam haben all diese Stoffe, dass sie das Potential haben, die Gesundheit von Mensch und Tier zu stören [Endocrine Disruption, 2006]. Bei den endokrinen Disruptoren kann es sich sowohl um synthetische Chemikalien (zum Beispiel Weichmacher, Flammschutzmittel, Pestizide, UV-Filter), als auch um natürliche Pflanzenprodukte wie die Flavonoide handeln [Überblick in Waring & Harris, 2005].

Flavonoide sind pflanzliche Polyphenole, die sich durch eine Diphenylpropan-Grundstruktur (C6-C3-C6) auszeichnen und für einen Großteil der Farben und Aromen von Pflanzen verantwortlich sind [Ross & Kasum, 2002]. Sie spielen außerdem eine Rolle bei der Regulation des Pflanzenwachstums [Brown et al., 2001], beim Schutz der Pflanze vor schädlichen UV-Strahlen, bei der Abwehr von Pathogenen und dem Schutz vor Pflanzen fressenden Insekten und Säugetieren [Überblick in Harborne & Williams, 2000]. Die mehr als 4000 bekannten Flavonoide werden in 8 Gruppen unterteilt: die Flavone (zum Beispiel Apigenin), die Flavonole (zum Beispiel Myricetin), die Flavanone, die Catechine, die Anthocyanidine, die Isoflavone (zum Beispiel Genistein), die Dihydroflavonole und die Chalcone (zum Beispiel Xanthohumol) [Cook & Samman, 1996].

Verschiedene endokrine Disruptoren wurden ausführlich bezüglich ihrer Beeinflussung der Entwicklung und der Regulation des reproduktiven Systems untersucht [Toppari, 2002]. Inzwischen wird es aber auch immer mehr akzeptiert, dass auch die Schilddrüse ein Ziel für endokrine Disruptoren darstellt [Überblick in Köhrle, 2008]. Angriffspunkte für den Eingriff in das komplexe Regelsystem des Schilddrüsenhormonstoffwechsels sind dabei neben der TPO [Chang & Doerge, 2000] auch der Natrium-Iodid-Symporter [Schröder-van der Elst et al., 2004], die Typ I 5'-Deiodase [Ferreira et al., 2002], das Schilddrüsenhormontransportprotein Transthyretin [Lueprasitsakul et al., 1990] und der Schilddrüsenhormonrezeptor [Zoeller, 2005].

In dieser Arbeit wurden sechs verschiedene Stoffe (Abb. 1-12) in Hinblick auf ihre Wirkung auf die TPO und damit auf die Schilddrüsenhormonsynthese untersucht. Diese werden anschließend bezüglich ihrer Herkunft, ihrer Eigenschaften und ihrer bereits bekannten Effekte als endokrine Disruptoren, besonders auf die Schilddrüsenhormonachse, vorgestellt.

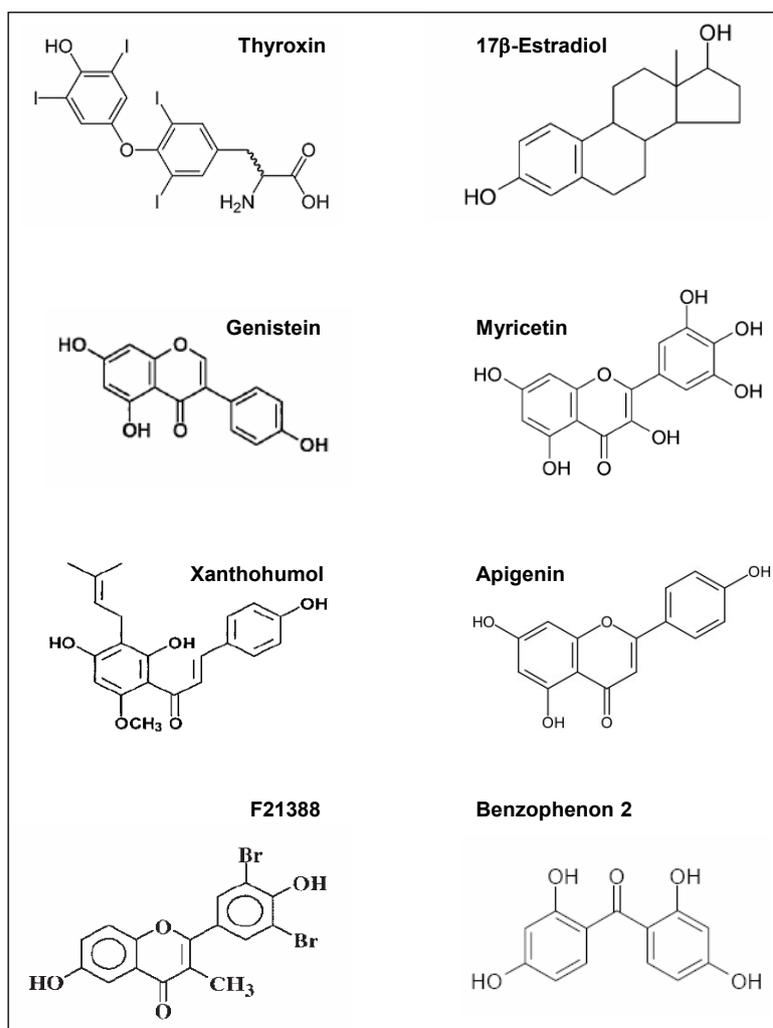


Abb. 1-12: Strukturformeln der verwendeten endokrinen Disruptoren und zum Vergleich von Thyroxin und 17β-Estradiol

1.3.1. Genistein

Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavon) gehört zu den Isoflavonen, die in der Natur fast ausschließlich in der Unterfamilie Papilionoideae (Schmetterlingsblütler) der Leguminosae (Hülsenfrüchtler) vorkommen [Dixon & Ferreira, 2002]. Die Hauptquelle

für Isoflavone und damit auch für Genistein sind Soja und Sojaprodukte, die je nach Zubereitung zwischen 19 µg/g (Alkoholextrakt) und 1426 µg/g (geröstete Sojabohnen) Genistein enthalten. Andere Bohnen, Linsen, Erbsen und Klee enthalten im Vergleich dazu nur eine sehr geringe Menge an Isoflavonen [Bhathena & Velasquez, 2002].

In Versuchen mit Ratten konnte gezeigt werden, dass Genistein aus der Nahrung aufgenommen wird und sich dosisabhängig in verschiedenen Organen, zum Beispiel der Schilddrüse [Chang et al., 2000, Chang & Doerge, 2000] oder den Fortpflanzungsorganen (Uterus, Ovar, Hoden, Prostata, Mamma) anreichert [Chang et al., 2000]. Außerdem konnte Genistein nach oraler Aufnahme durch Ratten sowohl in der Muttermilch als auch im Blut der gesäugten Jungtiere nachgewiesen werden [Doerge et al., 2006].

Genistein werden verschiedene gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben, die neben anderen Mechanismen, wie zum Beispiel Hemmung von Tyrosinkinase [Akiyama et al., 1987], Hemmung der Topoisomerase II [Markovits et al., 1989], Auslösung der Apoptose [Li et al., 1999], Hemmung der Angiogenese [Fotsis et al., 1993] oder antioxidante Wirkung [Choi et al., 2003], auf dessen Interaktion mit den Östrogenrezeptoren alpha und beta zurückgeführt werden [Kuiper et al., 1998].

So ergaben sich in verschiedenen Untersuchungen Hinweise, dass sich durch Sojakonsum dosisabhängig der Menstruationszyklus bei prämenopausalen Frauen verlängert und die Plasmaöstrogenkonzentration vermindert [Nagata et al., 1998]. Auch zeigten einige Studien positive östrogenartige Effekte von Sojaisoflavonen auf menopausale Hitzewallungen, während andere Studien keinen Effekt im Vergleich zu Placebo beziehungsweise Soja ohne Isoflavone beobachteten [Überblick in Carroll, 2006].

In Versuchen an männlichen und weiblichen Ratten, die mit der Nahrung Genistein zu sich nahmen, konnte nachgewiesen werden, dass Genistein östrogenartige Wirkungen in verschiedenen Geweben wie Mamma, Ovarien, Hoden, Prostata und Hypophyse zeigt [Delclos et al., 2001].

Auch nach der oralen Aufnahme von Genistein über 5 Tage durch neugeborene Mäuse zeigten sich akute östrogene Effekte in Uterus, Ovar und Thymus und außerdem bei den weiblichen Tieren chronische Veränderungen im Ovar und im Sexualzyklus bei normaler Fertilität [Cimafranca et al., 2010]. Vergleichbare Effekte auf die Sexualorgane in stärkerer Ausprägung wurden bei weiblichen Mäusen beobachtet, die an den ersten

fünf Lebenstagen oral Genistin erhielten, die glykosylierte Form von Genistein, die einen Hauptbestandteil der im Soja vorkommenden Isoflavone ausmacht [Jefferson et al., 2009].

Es wurde auch beobachtet, dass Genistein in vitro wie Östrogen die Knochenresorption durch die Osteoklasten hemmt und die Osteoblasten stimuliert [Überblick in Setchell & Lydeking-Olsen, 2003]. In ovariectomierten Mäusen (einem Modell für postmenopausale Osteoporose) verhindert Genistein wie Östrogen den Knochenabbau [Ishimi et al., 1999]. Diese Beobachtung wurde auch in einer Diätstudie an postmenopausalen Frauen bestätigt, in der Genistein die Knochenresorption reduzierte und die Knochenneubildung steigerte [Morabito et al., 2002].

In vitro wurde für verschiedene Tumorzelllinien, unter anderem für das Mammakarzinom [Peterson & Barnes, 1996] und das Prostatakarzinom [Onozawa et al., 1998], eine wachstumshemmende Wirkung nachgewiesen. Für die beiden genannten Tumorarten ergaben sich auch in vivo Hinweise auf protektive Effekte durch Genistein in Nagetiermodellen [Lamartiniere et al., 2002] und durch Soja beim Menschen [Shu et al., 2001, Lee et al., 2003], die aber besonders beim Mammakarzinom noch kontrovers diskutiert werden [Peeters et al., 2003].

Allerdings wurde in einem Xenograft-Modell des Prostatakarzinoms, bei dem klinische Prostatektomieproben in immundefiziente Mäuse implantiert wurden, eine Tumorprogression durch oral zugeführtes Genistein beobachtet [Nakamura et al., 2011].

Für das hepatozelluläre Karzinom konnten in vitro und in einem Xenograft-Mausmodell wachstums- und metastasierungshemmende Effekte durch Genistein gezeigt werden [Gu et al., 2009].

Auch auf das Herz-Kreislauf-System wurden positive Effekte durch Genistein beobachtet. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass Genistein sowohl in vitro die LDL-Oxidation hemmt und Endothelzellen vor Schäden durch oxidiertes LDL schützt [Kapiotis et al., 1997], als auch östrogenartige gefäßprotektive Effekte im Ratten-Karotis-Verletzungsmodell auslöst und die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen hemmt [Makela et al., 1999]. Außerdem wurde beobachtet, dass Soja-Isoflavone die Thrombozytenaktivierung in Ratten hemmen [Schoene & Guidry, 1999], die Serumcholesterin- und -LDL-Konzentration sowohl beim Affen [Anthony et al., 1997] als auch beim Menschen senken [Anderson et al., 1995] und die arterielle

Compliance bei perimenopausalen Frauen steigern [Nestel et al., 1997]. In einer Kohortenstudie an 64915 chinesischen Frauen, die über 2,5 Jahre beobachtet wurden, konnte nachgewiesen werden, dass das Risiko eine koronaren Herzerkrankung zu entwickeln durch Sojakonsum dosisabhängig reduziert wird [Zhang et al., 2003].

Auch die Schilddrüse stellt ein endokrines Zielorgan für die Wirkung von Genistein dar. In vitro verdrängt Genistein Thyroxin aus der Bindung an sein Transportprotein Transthyretin [Radovic et al., 2006] und beeinflusst die Typ I-Deiodase [Mori et al., 1996]. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Genistein konzentrationsabhängig das Wachstum verschiedener Schilddrüsen-Tumorzelllinien (follikuläres, papilläres und anaplastisches Karzinom) hemmt, auf follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen redifferenzierend wirkt [Kang et al., 2011] und den Iodidgehalt von stabil mit hNIS transfizierten FTC133-Zellen (ein follikuläres Karzinom) erniedrigt [Schröder-van der Elst et al., 2004].

Da für Genistein auch gezeigt werden konnte, dass es einen hemmenden beziehungsweise inaktivierenden Effekt auf die TPO in vitro und in vivo hat [Divi et al., 1997, Chang & Doerge, 2000], diente diese Substanz in den durchgeführten Versuchen als Positivkontrolle.

1.3.2. Myricetin

Das Flavonol Myricetin (3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavon) ist ein in der Pflanzenwelt weit verbreiteter Stoff und kommt unter anderem in verschiedenen Obst- und Gemüsesorten, Gewürzen und Tee vor [Miean & Mohamed, 2001]. Der Myricetingehalt beträgt in verschiedenen Rotweinen bis zu 22,6 mg/l [Vuorinen et al., 2000] und in verschiedene Beerenarten zwischen 14 und 142 mg/kg [Hakkinen et al., 1999]. An Ratten, die oral Myricetin zu sich nahmen, konnte gezeigt werden, dass Myricetin beziehungsweise seine Abbauprodukte nur von Tieren mit intakter Darmflora resorbiert und im Urin ausgeschieden werden konnten [Griffiths & Smith, 1972].

Für Myricetin wurden bereits viele verschiedene biologische Wirkungen beschrieben, die zum größten Teil auf Versuchen in vitro basieren. Dazu gehören unter anderem die antioxidative, prooxidative, DNA-zersetzende, antikarzinogene, mutagene, antivirale, antiarteriosklerotische und die antithrombotische Wirkung, die Hemmung von DNA-

Replikation und -Reparatur [Übersicht in Ong & Khoo, 1997], sowie die Hemmung der Mastzelldegranulation [Kempuraj et al., 2005], des Glucosetransporters GLUT4 in Adipozyten [Strobel et al., 2005] und die vasokonstriktorische Wirkung an isolierten Rattenaorten [Jimenez et al., 1999].

Myricetin wirkt auch auf das endokrine System. So bindet es an die Östrogenrezeptoren (ER) alpha und beta und stimuliert wie Östrogen wahrscheinlich über ER alpha das Wachstum von MCF7-Mammakarzinomzellen [Maggiolini et al., 2005].

In der stabil mit dem humanen Natrium-Iodid-Symporter (hNIS) transfizierten follikulären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC 133 hemmt die Zugabe von Myricetin das Tumorzellwachstum, steigert den Iodideinstrom, verlangsamt den Iodidausstrom und führt dadurch zu einer erhöhten intrazellulären Iodidkonzentration [Schröder-van der Elst et al., 2004]. Außerdem hemmt Myricetin in einem Tyrosin-Iodierungsassay mit gereinigter Schweine-TPO reversibel die TPO mit einem IC₅₀-Wert von 0,6 µM, zeigt aber keine TPO-Inaktivierung [Divi & Doerge, 1996].

1.3.3. Xanthohumol

Xanthohumol ist ein strukturell einfaches prenyliertes Chalcon, das ausschließlich in der Hopfenpflanze (*Humulus lupulus* L.) vorkommt, wo es das wichtigste Prenylflavonoid in den weiblichen Blütenständen, den sogenannten Hopfendolden, ist. Da Hopfen hauptsächlich dazu verwendet wird, dem Bier sein ausgeprägtes Aroma und die typische Bitterkeit zu verleihen, stellt Bier die Hauptnahrungsquelle für Xanthohumol dar. Der Xanthohumolgehalt verschiedener Biersorten variiert zwischen 2 und 690 µg/l, während das beim Brauprozess aus Xanthohumol durch Isomerisierung entstehende Isoxanthohumol in deutlich höheren Konzentrationen (40 bis 3440 µg/l) nachweisbar ist. Nach oraler Gabe konnte Xanthohumol in Ratten hauptsächlich in Form von zwei Glucuroniden nachgewiesen werden, während die Aufnahme von reinem Xanthohumol aufgrund der ausgeprägten Metabolisierung durch Darmbakterien wahrscheinlich sehr gering ist [Stevens & Page, 2004]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Bakterien im menschlichen Darm in der Lage sind, Isoxanthohumol in das sehr potente Phytoöstrogen 8-Prenylnaringenin umzuwandeln [Possemiers et al., 2006].

Xanthohumol wirkt präventiv gegen die Entstehung von verschiedenen Krebsarten durch mehrere unterschiedliche Mechanismen. Es hemmt verschiedene Cytochrom P450-Enzyme, die Karzinogenvorläufer wie das in gekochtem Essen vorkommenden 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin zu starken Mutagenen aktiviert [Miranda et al., 2000a], induziert Enzyme, die Karzinogene detoxifizieren wie die Quinonreduktase und wirkt antioxidativ, antiinflammatorisch und antiproliferativ [Gerhauser et al., 2002]. Des Weiteren hemmt Xanthohumol in vitro das Wachstum verschiedener Tumorzellarten, zum Beispiel von Mammakarzinom-, Kolonkarzinom- und Ovarialkarzinomzellen [Miranda et al., 1999], medullären Schilddrüsenkarzinomzellen [Cook et al., 2010] und wirkt antiangiogenetisch [Albini et al., 2006].

Für Xanthohumol wurde außerdem beschrieben, dass es antiinfektiös gegen Bakterien, Viren, Pilze und Plasmodien wirkt [Überblick in Gerhauser, 2005] und sowohl die LDL-Oxidation in vitro [Miranda et al., 2000b] als auch die Expression der induzierbaren NO-Synthase und damit die NO-Synthese in aktivierten Makrophagen hemmt [Zhao et al., 2003].

Xanthohumol zeigt keine östrogene aber eine ausgeprägte antiöstrogene Wirkung in vitro, während Isoxanthohumol sowohl östrogen als auch antiöstrogen wirkt [Gerhauser et al., 2002] und 8-Prenylnaringenin eine starke östrogene Aktivität zeigt [Milligan et al., 1999]. Des Weiteren hemmt Xanthohumol die Östrogensynthese durch die Aromatase [Monteiro et al., 2006].

Bezüglich der Wirkung von Xanthohumol auf die Schilddrüsenhormonachse gibt es bisher kaum Untersuchungen. Es wurde lediglich gezeigt, dass Xanthohumol in vitro die Iodidaufnahme in Rattenschilddrüsenzellen (FRTL-5) stimuliert [Radovic et al., 2005], die T₄-Bindung an Transthyretin in Menschen- und Rattenserum kompetitiv hemmt und in Ratten die hepatische Expression von Genen beeinflusst, die bei der Schilddrüsenhormonverteilung und –metabolisierung eine Rolle spielen (Thyroxin-bindendes Globulin, Transthyretin, Albumin, TSH, Typ-1-Deiodase, Sulfotransferase Sult1A1, UDP-Glucuronyltransferase 1A1, Kernrezeptor CAR [constitutive androstane receptor]) [Radovic et al., 2010].

1.3.4. Apigenin

Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavon) ist ein Flavon, das in verschiedenen Pflanzen, Gemüsesorten, Früchten und Kräutern vorkommt [Hu et al., 2003], zum Beispiel in Petersilie, Sellerie [Manach et al., 2004], Knoblauch, Erbsen, Chinakohl, Paprika und Guaven [Miean & Mohamed, 2001].

Apigenin konnte beim Menschen nach oraler Aufnahme sowohl im Blut als auch im Urin nachgewiesen werden [Meyer et al., 2006]. Bei Versuchen mit Ratten ergaben sich Hinweise, dass oral gegebenes radioaktiv markiertes Apigenin zu einem hohen Prozentsatz aus dem Darm resorbiert wird und im Körper akkumuliert [Gradolatto et al., 2005].

Für Apigenin wurden bisher vielfältige biologische Wirkungen beschrieben. So hemmt Apigenin *in vitro* das Wachstum verschiedener Tumorzelllinien, zum Beispiel bei Mammakarzinom, Cervixkarzinom, Kolonkarzinom, Schilddrüsenkarzinom, Magenkarzinom, Neuroblastom, Bronchialkarzinom, Ovarialkarzinom, Prostatakarzinom und Leberkarzinom. Für die letzten vier genannten Tumorarten konnten auch *in vivo* in Nagetiermodellen wachstumshemmende Effekte durch Apigenin nachgewiesen werden [Überblick in Shukla & Gupta, 2010].

Des Weiteren konnte für Apigenin *in vitro* unter anderem gezeigt werden, dass es antiinflammatorische [Kowalski et al., 2005], vasodilatatorische [Woodman & Chan, 2004], antimutagene [Miyazawa & Hisama, 2003], antibakterielle [Basile et al., 2000, Sato et al., 2000], antiarteriosklerotische [Choi et al., 2004] Wirkungen besitzt und dass es die Thrombozytenaggregation *in vitro* aber wahrscheinlich nicht *in vivo* hemmt [Janssen et al., 1998].

Für Apigenin wurden auch verschiedene Effekte auf das Hormonsystem beschrieben. So bindet und aktiviert es die Östrogenrezeptoren alpha und beta *in vitro* [Harris et al., 2005] und zeigt in Versuchen mit Ratten eine östrogenartige uterotrope Wirkung [Hiremath et al., 2000]. Apigenin stimuliert *in vitro* die Progesteronproduktion in Granulosa-Luteal-Zellen von Ratten [Nejaty et al., 2001] und weist in der Zellkultur an Brustkrebszellen progesteronartige Wirkungen auf [Zand et al., 2000]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Apigenin in humanen Granulosa-Luteal-Zellen die Aromatase hemmt, das Enzym das die Bildung von Östrogenen aus Androgenen katalysiert [Whitehead & Lacey, 2003].

An Wirkungen auf die Schilddrüsenhormonachse konnte zum einen beobachtet werden, dass Apigenin eine starke hemmende Wirkung auf die TPO hat [Sartelet et al., 1996]. Außerdem zeigte Apigenin auf die stabil mit hNIS transfizierte follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC 133 neben der bereits beschriebenen wachstumshemmenden Wirkung eine nach vier Tagen zu beobachtende Reduktion des Iodidgehalts der Zellen, die auf einen gesteigerten Iodidausstrom und eine signifikante Reduktion der NIS-RNA-Expression zurückzuführen war [Schröder-van der Elst et al., 2004].

1.3.5. F21388

F21388 (3-Methyl-4',6-dihydroxy-3',5'-dibromoflavon) ist ein synthetisches Flavonoid, das als Modell für die Interaktion von natürlichen Flavonoiden mit dem Schilddrüsenhormonsystem mittels molekularem Wirkstoffdesign entwickelt wurde [Schröder-van der Elst et al., 1997]. Als T₄-Analogon hemmt es in vitro die hepatische Typ I 5'-Deiodase [Spanka et al., 1990] und verdrängt T₄ aus der Bindung an Transthyretin [Köhrle et al., 1989].

In vivo zeigte sich in verschiedenen Versuchen an Ratten, dass F21388 sowohl die Schilddrüsenhormonsynthese als auch den Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone außerhalb der Schilddrüse beeinflusst. In Kurzzeitversuchen mit Bolusgaben von F21388 wurden Effekte beobachtet, die auf die akute Verdrängung von T₄ aus der Bindung an Transthyretin zurückzuführen sind, zum Beispiel ein vorübergehend erhöhtes freies T₄ und ein erniedrigtes TSH [Lueprasitsakul et al., 1990]. In einem Langzeitversuch, in dem Ratten über 14 Tage zwei Mal täglich F21388 als intravenöse Bolusinjektion erhielten, zeigte sich unter anderem, dass die Schilddrüse weniger T₄ und mehr T₃ sezernierte, dass die Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Plasma bei erhöhten Plasmaclearanceraten für T₃ und T₄ und unveränderten TSH-Werten erniedrigt waren, dass die extrathyroidale T₃-Bildung durch 5'-Deiodierung erniedrigt war und dass die T₄-Konzentration in allen untersuchten Geweben deutlich erniedrigt war, während die T₃-Konzentration nur in den Geweben sank, in denen die Typ II 5'-Deiodase exprimiert wird [Schröder-van der Elst et al., 1991]. In einem anderen Versuch an trächtigen Ratten ergaben sich Hinweise, dass F21388 in der Lage ist, über

die Plazenta in den fetalen Kreislauf zu gelangen und dort die Menge an extrathyroidalem T_4 zu senken und von T_3 zu erhöhen [Pedraza et al., 1996].

Die beschriebenen Eigenschaften machen F21388 zu einem nützlichen Hilfsmittel bei der Untersuchung der intrazellulären Schilddrüsenhormonregulation in vitro und auch in vivo durch Beeinflussung der T_4 -Produktion, des T_4 -Metabolismus und der T_4 -Exkretion [Schröder-van der Elst et al., 1997].

Außerdem konnte gezeigt werden, dass F21388 in vitro die Topoisomerase I hemmt und somit potentiell antiproliferativ wirkt [Boege et al., 1996]. Auf die stabil mit hNIS transfizierte follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC 133 zeigte F21388 eine deutlich wachstumshemmende Wirkung und eine sowohl akut als auch nach vier Tagen zu beobachtende Reduktion des Iodidgehalts der Zellen, die auf einen gesteigerten Iodidausstrom und eine signifikante Reduktion der NIS-RNA-Expression zurückzuführen war [Schröder-van der Elst et al., 2004].

1.3.6. Benzophenon 2

Benzophenon 2 (2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon) ist ein synthetischer Stoff, der in der Kosmetikindustrie und bei der Plastikherstellung als UV-Filter benutzt wird. Dabei dient Benzophenon 2 in Kosmetika (zum Beispiel in Parfum, Lippenstiften u.a.) dazu, die Produktstabilität und -haltbarkeit zu verbessern und Düfte und Farben vor einer Schädigung durch ultraviolettes Licht zu schützen. Plastikprodukte werden durch den Zusatz von UV-Filtern wie Benzophenon 2 vor lichtinduzierten Abbauprozessen geschützt [Jarry et al., 2004, Schlecht et al., 2004].

Für den dem Benzophenon 2 ähnelnden UV-Filter Benzophenon 3 (2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon) konnte gezeigt werden, dass er und seine Metabolite in Ratten sowohl im Blut als auch in verschiedenen Geweben nachweisbar sind, wenn er oral [Kadry et al., 1995] oder transdermal [Okereke et al., 1994] verabreicht wird. Im Menschen konnte Benzophenon 3 noch fünf Tage nach transdermaler Applikation im Urin nachgewiesen werden [Gonzales et al., 2006]. Für Benzophenon 2 steht der Nachweis der Absorption über die Haut oder den Darm noch aus. Dass der Mensch auch gefährdet ist, verschiedene UV-Filter mit der Nahrung aufzunehmen, zeigt eine Untersuchung, die nachwies, dass sich die lipophilen Substanzen in frei lebenden

Süßwasserfischen anreichern [Nagtegaal et al., 1997]. Auch im Menschen kommt es zur Anreicherung von Benzophenon 3, wie dessen Nachweis in Muttermilchproben zeigt [Hany & Nagel, 1995].

Die verfügbaren Daten über die biologische Wirkung von Benzophenon 2 sind rar. Sie beziehen sich abgesehen vom Nachweis der Auslösung einer Kontaktallergie [Gimenez-Arnau et al., 2002] fast ausschließlich auf die östrogenen Wirkungen von Benzophenon 2. So zeigte sich *in vitro*, dass Benzophenon 2 die Östrogenrezeptoren alpha und beta bindet und wahrscheinlich über die Östrogenrezeptoren das Wachstum von MCF-7-Zellen (einer Brustadenokarzinom-Zelllinie) stimuliert [Matsumoto et al., 2005]. Wurde Benzophenon 2 dem Wasser zugesetzt, zeigten sich bei darin lebenden Fischen östrogene Effekte [Kunz et al., 2006]. In verschiedenen Versuchen an ovariectomierten Ratten wurde beobachtet, dass nach oraler Gabe von Benzophenon 2 wie bei Östrogengabe das Uterusgewicht zunimmt, das Vaginalepithel beeinflusst wird, die Blutkonzentrationen von LH, Cholesterin, HDL und LDL sinken, die IGF1-mRNA-Expression in der Vagina steigt und in der Leber sinkt, die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht abnehmen [Jarry et al., 2004], sich die Expression der Östrogenrezeptoren und der ERR (= estrogen receptor-related receptor) in Hypophyse, Schilddrüse und Uterus verändert [Schlecht et al., 2004] und eine antiosteoporotische Wirkung auftritt [Seidlova-Wuttke et al., 2004]. In den beschriebenen Versuchen zeigte sich außerdem, dass Benzophenon 2 im Gegensatz zu Östrogenen die Blutkonzentration von T₃ und T₄ senkt, ohne die TSH-Konzentration zu beeinflussen [Jarry et al., 2004]. Weitere Wirkungen von Benzophenon 2 auf die Schilddrüse wurden in Schmutzler et al., 2007 beschrieben; Teile der vorliegenden Arbeit haben in diese Publikation Eingang gefunden.

2. Fragestellung

Diese Arbeit war eingebettet in das von der EU geförderte Projekt EURISKED (Multi-organic Risk Assessment of Selected Endocrine Disruptors), in dem die Effekte ausgewählter endokriner Disruptoren auf verschiedene Organsysteme – in diesem Fall die Schilddrüsenhormonachse und speziell die TPO – untersucht wurden.

Da die Wirkungen verschiedener Stoffe auf die TPO möglicherweise speziesspezifisch sind, war es das Hauptziel, ein stabiles Messsystem mit humaner TPO zu etablieren, um in großem Umfang endokrine Disruptoren auf ihre potentielle Wirkung auf den Menschen screenen zu können.

Dies ist vor allem im Zusammenhang mit der am 01.06.2007 in Kraft getretenen europäischen Chemikalienverordnung REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) von Bedeutung, die festlegt, dass in der EU nur noch Stoffe in den Verkehr gebracht werden dürfen, die vorher registriert worden sind. Für diese Registrierung müssen u.a. Daten zur Toxikologie und Ökotoxizität vorgelegt werden [Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des europäischen Parlaments und des Rates].

Um erstmals ein humanes Testsystem für die Wirkung endokriner Disruptoren auf die TPO zu schaffen, das eine reproduzierbare, dauerhaft verfügbare Enzymquelle (unabhängig von eher heterogenen Operationspräparaten) enthält, wurde in dieser Arbeit eine neue Zelllinie - die humane follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC-238, die stabil mit dem Gen für humane TPO transfiziert wurde (FTC-238/TPO) - als Quelle für rekombinante TPO getestet und mit nativen TPO-Präparationen aus Schilddrüsenproben von Strumapatienten verglichen.

Da sich verschiedene bisher beschriebene rekombinante humane TPO-Präparationen im Vergleich mit Präparationen aus Schilddrüsenngewebe als nicht oder deutlich geringer enzymatisch aktiv erwiesen [Guo et al., 1998, Gardas et al., 1999] und rekombinante humane TPO aus diesem Grund als für katalytische Studien eher ungeeignet angesehen wurde [Taurog, 2000], war ein wichtiges Ziel, nachzuweisen, dass rekombinante humane TPO aus FTC-238/TPO eine vergleichbare enzymatische Aktivität ausweist wie die untersuchten menschlichen Strumaproben und zusätzlich stabilere, reproduzierbare Daten in den Hemmstoffversuchen liefert.

Die zweite Aufgabe war, herauszufinden welche Wirkung ausgewählte endokrine Disruptoren (Genistein, Myricetin, Xanthohumol, Apigenin, F21388 und Benzophenon 2) auf die TPO-Aktivität in dem beschriebenen Messsystem haben. Für die Stoffe, für die bereits eine Hemmung der TPO, die aus Schweineschilddrüsen oder aus menschlichen Strumen stammte, beschrieben wurde (Genistein, Myricetin, Apigenin), galt es zu zeigen, ob diese Wirkung in einem vergleichbaren Umfang auch auf die rekombinante humane TPO aus FTC-238/TPO zu beobachten ist und damit nachzuweisen, ob durch diese in der Nahrung enthaltenen beziehungsweise im Fall von Genistein zur postmenopausalen Hormonersatztherapie auch therapeutisch genutzten Stoffe ein potentiell Gesundheitsrisiko für den Menschen bestehen könnte.

Für die restlichen Stoffe, die alle bereits andere Wirkungen auf die Schilddrüsenhormonachse gezeigt haben (das im Hopfen und damit im Bier enthaltene Xanthohumol, der T₄-Antagonist F21388 und das synthetische, in Kosmetika enthaltene Benzophenon 2), stellte sich die Frage, ob sie auch die humane TPO beeinflussen.

3. Material und Methoden

3.1. TPO-Extraktpräparation

Die Grundlage für alle durchgeführten Messungen bildete ein TPO-haltiger Extrakt, der aus stabil mit humaner TPO transfizierten FTC-238 Zellen (freundlicherweise bereitgestellt von Petra Ambrugger, Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin) gewonnen wurde.

Die Vermehrung dieser Zellen erfolgte mittels Zellkultur bei 37°C und 5,2% CO₂ in basal Iscove Medium (Fa. Biochrom, Berlin), das mit 10% Fetal Bovine Serum (Fa. Biochrom, Berlin), 1% Penicillin / Streptomycin (10000 U / 10000 µg/ml; Fa. Biochrom, Berlin) und 1,4% G418 Sulfate (Fa. Calbiochem, San Diego) versetzt wurde. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt, gesplittet wurden die Zellen, wenn die Zellkulturflaschen konfluent bewachsen waren. Sobald eine ausreichende Anzahl Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 75 cm² konfluent bewachsen war, wurden diese ein letztes Mal 1:2 gesplittet und in Medium, dem 1 µg/ml Hematin (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) zugesetzt wurde, für 2 bis 4 Tage inkubiert. Das Kriterium für den Zeitpunkt der Ernte war die Dichte der Zellen in den Kulturflaschen. Dabei wurden die Zellen in 3 ml (pro Flasche) kaltem 1x PBS (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g/l KH₂PO₄, pH 7,4 mit HCl eingestellt) abgeschabt und gleichmäßig auf vier 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Diese wurden 10 min bei 1.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden jeweils in 3,5 ml 50 mM TrisHCl / 1 mM KI (pH 7,2) resuspendiert und anschließend mit 10 Impulsen a 0,6 s und 200 W sonifiziert (Labsonic[®] M Ultraschallprozessor, Fa. B. Braun Biotech International, Melsungen). Danach wurde die Suspension gleichmäßig auf 4 Beckman-Ultrazentrifugenröhrchen (je 3,8 ml) verteilt und in der Optima MAX Ultracentrifuge (Fa. Beckman Coulter, Palo Alto, USA) für 1h bei 31.000 rpm (100.000 x γ) und 4°C zentrifugiert. Nun wurden die Pellets jeweils in 3 ml 1%igem Digitonin (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) resuspendiert und für 24h bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Ultrazentrifugenröhrchen mit 1% Digitonin auf 3,8 ml aufgefüllt und noch einmal für 1h bei 31.000 rpm (100.000 x γ) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und man erhielt so pro Präparation ca. 15 ml eines TPO-haltigen Extraktes. Nach der Proteinbestimmung mit der Methode nach Bradford (Farbstoffkonzentrat „Bio-Rad Protein Assay“ und der Standard von Fa. Bio Rad Laboratories, München) wurde der Extrakt aliquotiert und 5 min bei 15.000 rpm und 4°C

zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, bei -80°C eingefroren und gelagert und für die Messungen wurden Aliquots jeweils frisch aufgetaut.

Um nachzuweisen, dass die Peroxidaseaktivität im Extrakt tatsächlich auf die TPO zurückzuführen ist, wurde der Extrakt im Inhibierungsassay (siehe unten) mit $50\ \mu\text{M}$ und $100\ \mu\text{M}$ PTU (6n-Propyl-2-thiouracil von Fa. MP Biomedicals, Eschwege) getestet. Bei allen Extrakten ließ sich die Enzymaktivität durch PTU hemmen.

Diese Art der Extraktpräparation wurde insgesamt sechs Mal durchgeführt. Dabei entstand bei der ersten Präparation aus 28 Flaschen à $150\ \text{cm}^2$, die für 2 Tage mit Hematin inkubiert wurden, der erste Extrakt TPO-Ex1. Für den zweiten Extrakt TPO-Ex2 wurde die Präparation zwei Mal mit je 42 Flaschen à $150\ \text{cm}^2$ durchgeführt, die jeweils 3 Tage mit Hematin inkubiert worden waren. Der dritte Extrakt TPO-Ex3 entstand aus 3 Präparationen, bei denen jeweils 40 Flaschen à $150\ \text{cm}^2$ der Ausgangspunkt waren. Diese waren zuvor für 3 beziehungsweise 4 Tage (bei einer Präparation) mit Hematin inkubiert worden.

3.2. Die endokrinen Disruptoren

Apigenin, Myricetin und Genistein stammten von der Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Benzophenon 2 von BASF, Ludwigshafen, Xanthohumol von Prof. Dr. Hans Becker (Universität Saarbrücken) und F21388 wurde von Prof. Dr. Peter Schreier (Institut für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Von allen endokrinen Disruptoren wurden $100\ \text{mM}$ Stammlösungen in DMSO (Dimethylsulfoxid von Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) hergestellt und bei -20°C gelagert. Daraus wurden die für die Messungen verwendeten geringer konzentrierten Lösungen mittels Verdünnung mit DMSO gewonnen.

3.3. TPO-Inhibierungsassay

Im TPO-Inhibierungsassay wurde die Wirkung von Apigenin, Benzophenon 2, F21388, Genistein, Myricetin und Xanthohumol in den unten angegebenen Konzentrationen auf die TPO untersucht.

	100 μM	50 μM	30 μM	20 μM	10 μM	5 μM	1 μM	600 nM	300 nM	100 nM	30 nM	10 nM	1 nM
Apigenin	x	x			x	x	x			x		x	x
BP 2							x	x	x	x	x	x	x
F21388	x	x		x	x	x	x			x		x	x
Genistein	x	x		x	x	x	x			x		x	x
Myricetin	x	x	x	x	x	x	x			x		x	x
Xanthohumol	x				x		x			x		x	x

Die Experimente erfolgten mit drei verschiedenen TPO-Extrakten (TPO-Ex1 für Apigenin, F21388, Genistein und Xanthohumol, TPO-Ex2 für Myricetin und TPO-Ex3 für Benzophenon 2). Um die Messergebnisse mit den verschiedenen Extrakten vergleichen zu können, wurden die Reaktionen so eingestellt, dass die eingesetzte Extraktmenge im Inhibierungsassay ohne Hemmstoff im Bereich des linearen Anstieges zwischen 20 und 50 s jeweils eine durchschnittliche Absorptionsänderung zwischen 0,11 und 0,14 pro Minute erzeugte. Dies war der Fall bei 24 μl TPO-Ex1, 12 μl TPO-Ex2 und 9 μl TPO-Ex3.

Die photometrischen Messungen erfolgten in Küvetten der Fa. Sarstedt, Nümbrecht mit 1 cm Lichtweg, in die jeweils die folgenden Lösungen gegeben wurden:

- 100 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 (pH 7,4) → ad 1 ml
- 100 mM Guaiacol → 400 μl
- TPO-Extrakt 1, 2 oder 3 → 24, 12 oder 9 μl
- Endokriner Disruptor in DMSO oder DMSO als Kontrolle → 10 μl
- 0,03% H_2O_2 → 25 μl.

Dabei stammten das Guaiacol (2-Methoxyphenol) von der Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim und das H_2O_2 (30%) von der Fa. Merck, Darmstadt.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe des H_2O_2 gestartet und die Absorptionsänderung bei 470 nm und 30°C mit dem UV-Spectrophotometer U-2001 (Fa. Hitachi, Tokio, Japan) über 80 s aufgezeichnet.

Aus der Absorptionsänderung zwischen 20 und 50 s wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die TPO-Aktivität berechnet und als [$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ reduziert pro Minute und mg Protein] angegeben. Der Extinktionskoeffizient des Reaktionsproduktes 3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenochinon beträgt dabei $26600 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Pro untersuchter Hemmstoffkonzentration erfolgten mindestens 6 Messungen. Aus den ermittelten Messwerten wurden mit Microsoft Office Excel 2007 Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Der Mittelwert der Kontrollen (jeweils einer Extraktpräparation) wurde 100% gesetzt und alle anderen Messwerte entsprechend als Prozentwert darauf bezogen. Wenn möglich wurde ein IC_{50} -Wert mittels des Computerprogramms GraphPad Prism, Version 4.01 (GraphPad Software, San Diego) berechnet.

3.4. Vergleich der TPO-Extrakte

Die drei Extrakte TPO-Ex1, 2 und 3 stammen aus mehreren Präparationen aus FTC-238-TPO-Zellen (siehe oben), also aus einem artifiziellen System. Als Vergleich dienten 4 TPO-Extrakte, die von PD Dr. Cornelia Schmutzler mit der oben beschriebenen Methode aus humanen Schilddrüsenproben (Operationspräparate von weiblichen Strumapatienten, freundlicherweise zu Verfügung gestellt von PD Dr. Cuong Hoang-Vu, Experimentelle und chirurgische Onkologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) gewonnen wurden. Dabei entstanden jeweils aus 200 – 500 mg Schilddrüsengewebe 2 ml SD-Extrakt.

Um die sieben Extrakte im Inhibierungsassay vergleichen zu können, wurden die Reaktionen so eingestellt, dass die eingesetzte Extraktmenge ohne Hemmstoff im Bereich des linearen Kurvenanstieges zwischen 20 und 50 s jeweils eine durchschnittliche Absorptionsänderung zwischen 0,11 und 0,14 pro Minute erzeugte.

Jeder Extrakt wurde im TPO-Inhibierungsassay (siehe oben) mit 4 verschiedenen Konzentrationen Benzophenon 2 (1 μM , 600 nM, 300 nM, 100 nM) getestet. Die Messungen erfolgten pro Konzentration mindestens 2 Mal bei den Schilddrüsenextrakten und mindestens 3 Mal bei den TPO-Extrakten. Aus den ermittelten Messwerten wurden mit Microsoft Office Excel 2007 Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.

3.5. TPO-Inaktivierungsassay

Ausgangspunkt für diese Messungen war ein Experiment von Chang und Doerge [Chang & Doerge, 2000], die die zeitabhängige Inaktivierung der TPO für verschiedene Konzentrationen von Genistein beschrieben.

Da es bei den im Originalversuch beschriebenen Messbedingungen (Inkubation von 80 µg Protein aus Rattenschilddrüsen in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 10 – 1000 nM Genistein für 12 min bei Raumtemperatur nach Start der Reaktion mit 100 mM H₂O₂) bereits ohne Inhibitor nicht zu einem messbaren Kurvenanstieg kam, musste die Versuchsanordnung modifiziert werden, so dass die Experimente unter folgenden Bedingungen stattfanden.

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Inkubationsgefäß) wurden folgende Lösungen zusammengegeben:

- 100 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄ (pH 7,4) → ad 600 µl
- TPO-Ex3 → 60 µl (325,8 µg Protein)
- ED / DMSO (verschiedene Konzentrationen) → 10 µl (20 µl bei BP2)

Und bei einigen Messungen:

- KI (verschiedene Konzentrationen) → 6 oder 12 µl

Aus diesem Ansatz wurde zum Zeitpunkt 0 min ein Aliquot von 100 µl entnommen und mittels Guaiacol-Oxidationsassay die TPO-Aktivität photometrisch bestimmt. Die Küvette enthielt dabei, wie auch bei allen folgenden Messungen, 578 µl K₂HPO₄ / KH₂PO₄ (100 mM, pH 7,4), 400 µl Guaiacol (100 mM), 22 µl H₂O₂ (10 mM) und die Reaktion wurde durch die Zugabe des 100 µl Aliquots gestartet.

Direkt danach wurde die Reaktion im Inkubationsgefäß durch die Zugabe von 5 oder 15 µl H₂O₂ (1 µM, 3 µM oder 10 µM) gestartet und die verbleibende TPO-Aktivität nach 2,5 / 5,0 / 7,5 und 10,0 min durch Entnahme von 100 µl und photometrische Messung der Absorptionsänderung im Guaiacol-Oxidationsassay gemessen.

Einziges Ausnahme von diesem Prozedere war die Messung von Genistein, F21388 und Benzophenon 2 + 1 mM KI (spät). Dabei wurde das KI erst nach Entnahme des 2,5 min Aliquots in das Inkubationsgefäß gegeben, also nach dem Start der Reaktion durch H₂O₂, um zu testen ob die Zugabe von Iodid eine vorher erfolgte Inaktivierung der TPO wieder rückgängig machen kann.

Pro Messansatz wurden mindestens 3 Werte bestimmt und als Mittelwert \pm Standardabweichung (mit Microsoft Office Excel 2007 berechnet) dargestellt.

Unter der Annahme, dass alle zum Zeitpunkt 0 min im Inkubationsgefäß befindlichen Stoffe ohne H₂O₂ keinen Einfluss auf die Aktivität der TPO haben, wurde aus den Startwerten aller Messungen der Mittelwert gebildet, dieser 100% gesetzt und alle weiteren Messwerte als Prozentwerte bezogen auf diesen 100%-Wert dargestellt.

Im Einzelnen erfolgten folgende Messungen für F21388 (F), Genistein (G), Myricetin (MY) und Benzophenon 2 (BP 2):

1. Kontrollen

	TPO-Ex3	TPO-Ex3 + 200 μ M KI
10 μ l DMSO	x	x
10 μ M F	x	x
10 μ M G	x	x
10 μ M MY	x	x
300 nM BP 2	x	x
1 μ M H ₂ O ₂	x	x
3 μ M H ₂ O ₂	x	x
10 μ M H ₂ O ₂	x	x

2. F21388, Genistein und Myricetin ohne und mit 200 μ M KI

ED	100 nM	1 μ M	10 μ M
1 μ M H ₂ O ₂			x
3 μ M H ₂ O ₂			x
10 μ M H ₂ O ₂	x	x	x

3. Benzophenon 2 ohne und mit 200 μ M KI

BP 2	10 nM	100 nM	300 nM
1 μ M H ₂ O ₂			x
3 μ M H ₂ O ₂			x
10 μ M H ₂ O ₂	x	x	x

4. Test der Wirkung von KI

ED	10 μ M F	10 μ M G	300 nM BP 2
H ₂ O ₂	10 μ M	10 μ M	10 μ M
1 μ M KI	x	x	x
10 μ M KI	x	x	x
100 μ M KI	x	x	x
1 mM KI	x	x	x
1 mM KI (spät)	x	x	x

4. Ergebnisse

4.1. TPO-Inhibierungsassay

Im Inhibierungsassay wurde eine bestimmte Menge TPO-Extrakt verschiedenen endokrinen Disruptoren ausgesetzt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von H_2O_2 gestartet, die Absorptionsänderung bei 470 nm gemessen und daraus die TPO-Aktivität berechnet. Dabei zeigte sich bei Apigenin und Xanthohumol kein größerer Effekt im Sinne einer halbmaximalen Hemmung auf die TPO (siehe Abb. 4-1A und B). Genistein, F21388 und Benzophenon 2 hemmten die TPO konzentrationsabhängig mit einem IC_{50} -Wert von 50,6 μM , 37,5 μM beziehungsweise 513 nM (siehe Abb. 4-2A-C).

Für Myricetin konnte eine deutliche Hemmung der TPO-Aktivität für 100 und 50 μM gezeigt werden (siehe Abb. 4-3A). Im Konzentrationsbereich von 30 bis 5 μM ergaben sich keine verwertbaren Kurven (siehe Abb. 4-3C). Betrachtet man die UV-Spektren der Reaktionsgemische vor und nach der Reaktion, zeigt sich, dass bei hohen Myricetinkonzentrationen vor der Reaktion ein Peak bei 381 nm auftritt, der ab 50 μM nach der Reaktion deutlich niedriger ausfällt. Außerdem fehlt der Peak des Guaiacol-Oxidationsproduktes bei 470 nm zwischen 20 und 100 μM Myricetin nahezu völlig. Dafür erscheint bei diesen Myricetinkonzentrationen ein zusätzlicher Peak bei etwa 330 nm (siehe Abb. 4-4).

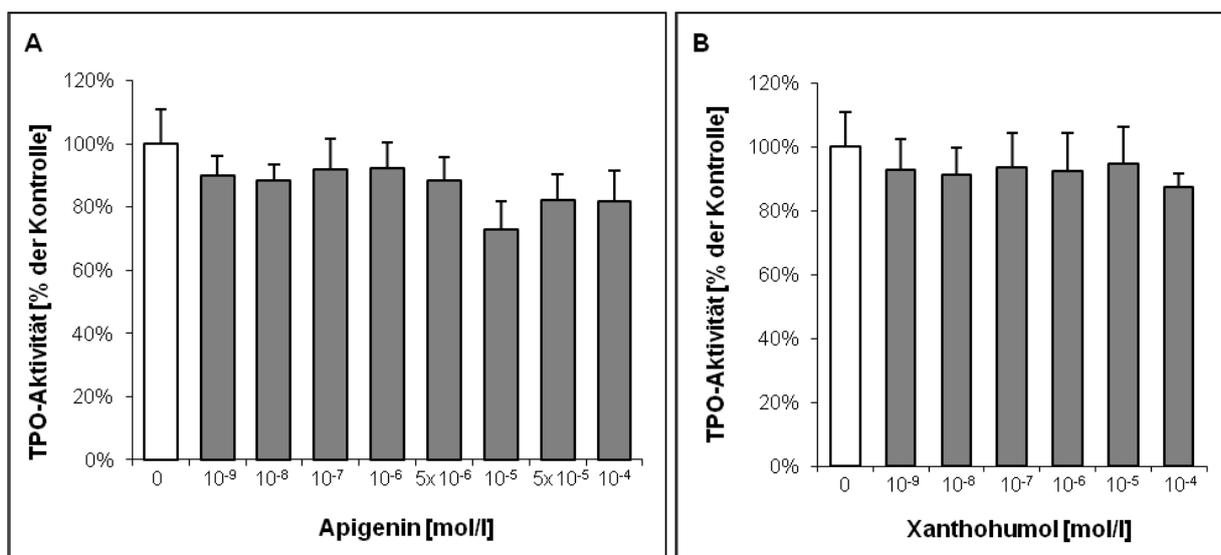


Abb. 4-1: Inhibierung der TPO im Guaiacol-Oxidationsassay durch Apigenin (A) und Xanthohumol (B). Gezeigt ist die verbleibende TPO-Aktivität in Prozent bezogen auf die Kontrolle ohne endokrinen Disruptor als Mittelwert + Standardabweichung aus mindestens 6 Messungen.

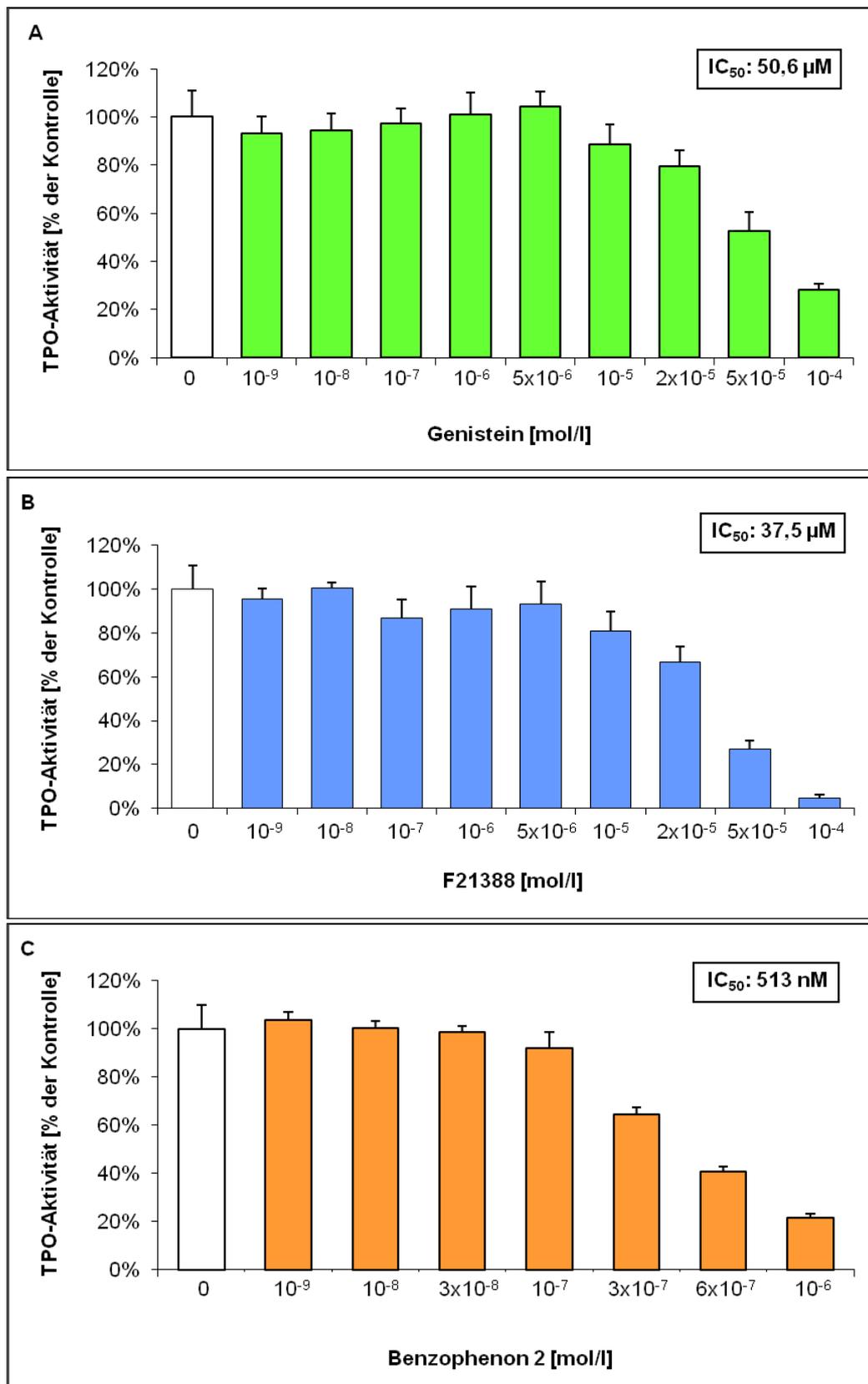


Abb. 4-2: Inhibierung der TPO im Guaiacol-Oxidationsassay durch Genistein (A), F21388 (B) und Benzophenon 2 (C). Gezeigt ist die verbleibende TPO-Aktivität in Prozent bezogen auf die Kontrolle ohne endokrinen Disruptor als Mittelwert + Standardabweichung aus mindestens 6 Messungen.

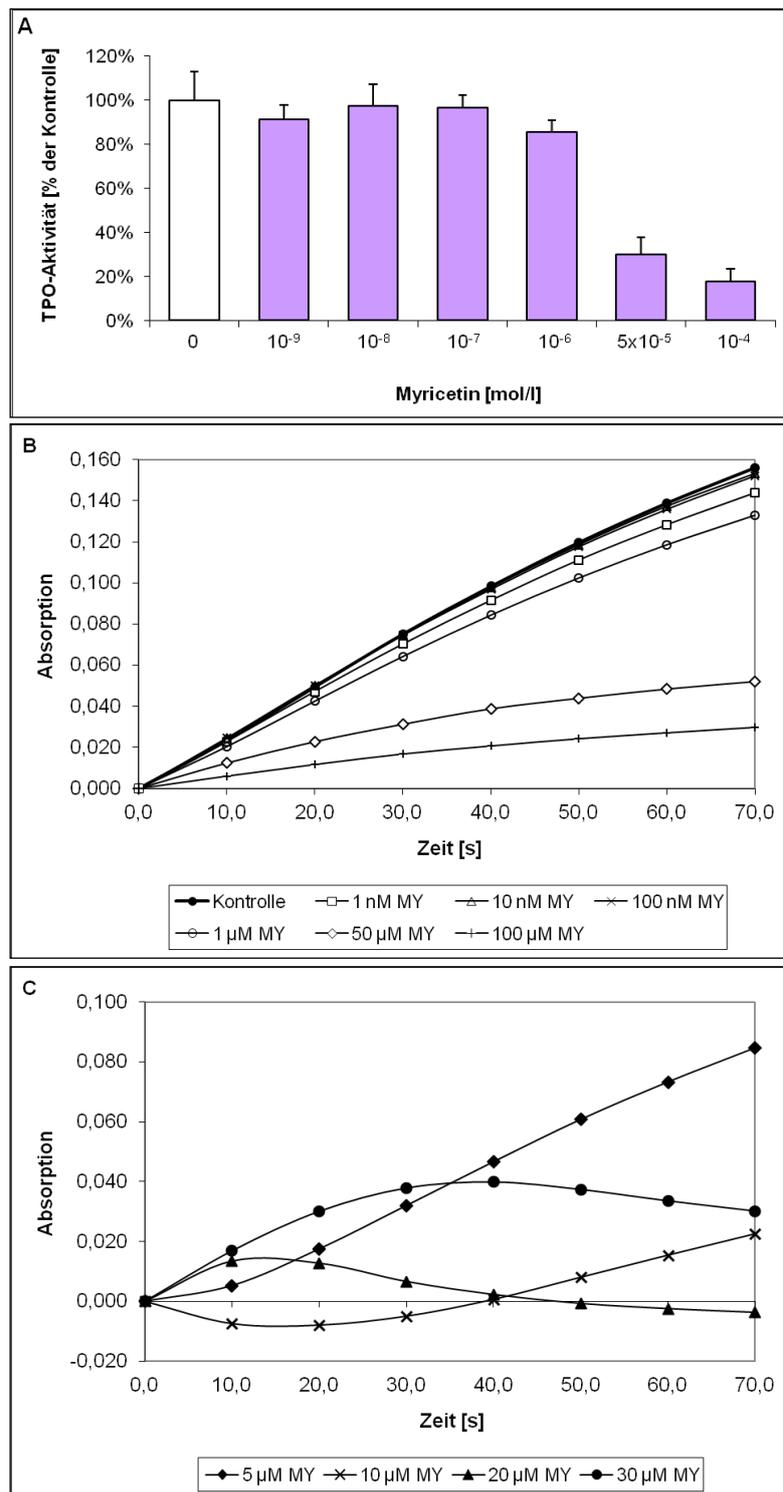


Abb. 4-3: Inhibition der TPO im Guaiacol-Oxidationsassay durch Myricetin. A: verbleibende TPO-Aktivität in Prozent bezogen auf die Kontrolle ohne endokrinen Disruptor als Mittelwert + Standardabweichung aus mindestens 6 Messungen, B und C: Absorptionsänderung im Guaiacol-Oxidationsassay bei 470 nm für verschiedene Konzentrationen Myricetin (MY) im Vergleich zur Kontrolle (ohne Myricetin). Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils mindestens 8 Messungen. Zu beachten ist die unterschiedliche Skaleneinteilung der y-Achse in den beiden Diagrammen.

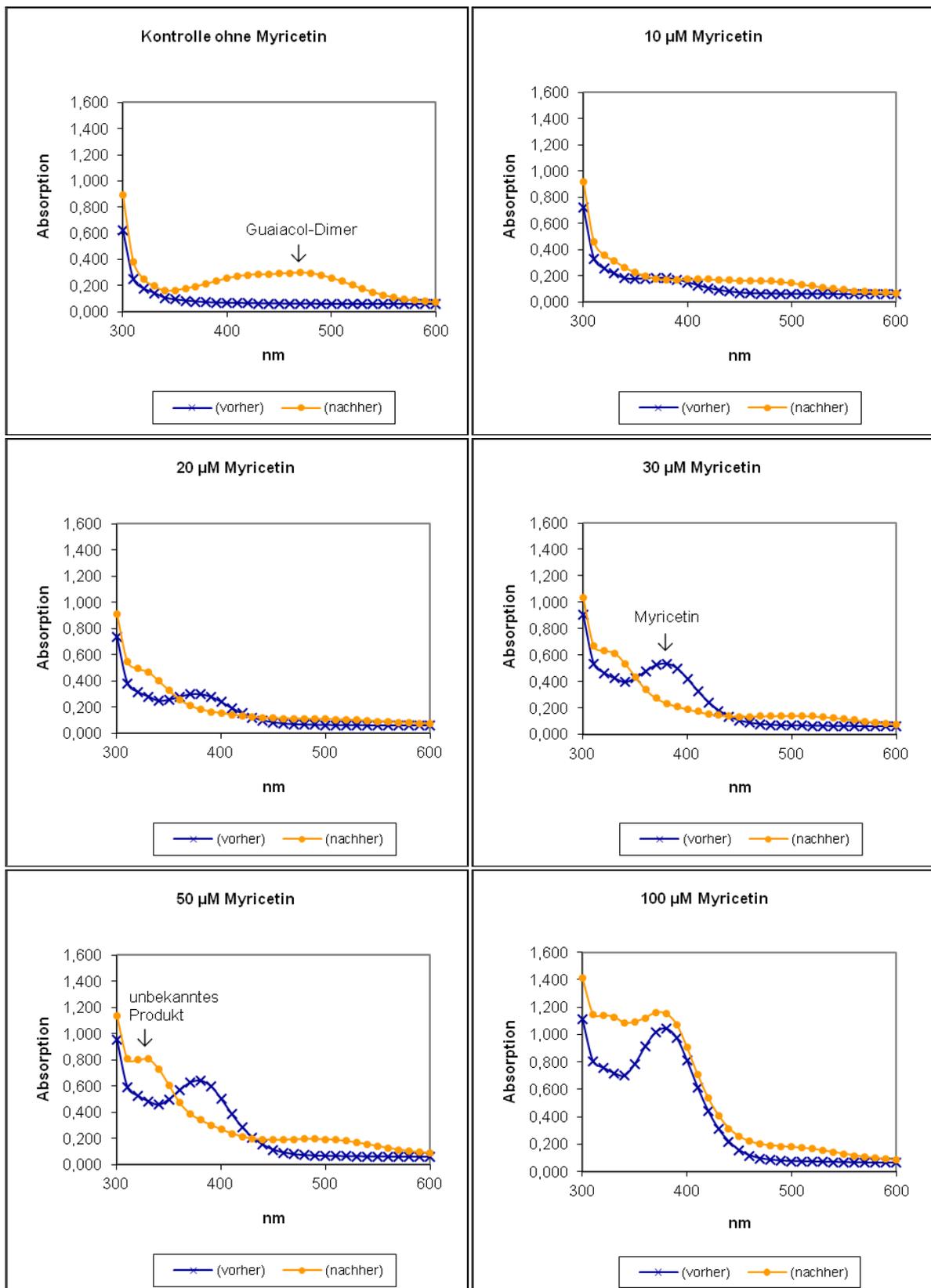


Abb. 4-4: UV-Spektrum zwischen 300 und 600 nm für verschiedene Konzentrationen von Myricetin im Vergleich zur Kontrolle ohne Myricetin. Dargestellt ist jeweils eine Messung vor dem Start der Reaktion im Guaiacol-Oxidationsassay mit H_2O_2 (vorher) und eine Messung nach Ablauf der Reaktion, 90 s nach dem Start (nachher).

4.2. TPO-Inaktivierungsassay

Der nächste Schritt war die Untersuchung, ob die Stoffe, die die TPO inhibieren – also Genistein, F21388, Myricetin und Benzophenon 2 – diese auch inaktivieren.

Dazu wurde die TPO-Aktivität in einem Inkubationsansatz, der in K_2HPO_4 / KH_2PO_4 -Puffer (pH 7,4) den TPO-Extrakt, den endokrinen Disruptor, bei einigen Messungen KI und zum Start der Reaktion H_2O_2 enthielt, nach 0 min (vor dem Start der Reaktion mit H_2O_2) / 2,5 / 5,0 / 7,5 und 10,0 min mittels Guaiacol-Oxidationsassay bestimmt. Bei allen Versuchen zeigte sich, dass die Reaktion sehr schnell abläuft und nach 2,5 min kein Effekt mehr zu beobachten ist (Beispiel siehe Abbildung 4-5). Aus diesem Grund werden alle Ergebnisse im weiteren Verlauf als TPO-Restaktivität nach 2,5 min bezogen auf den 0 min-Startwert dargestellt.

Da zum Zeitpunkt 0 min die Reaktion noch nicht gestartet wurde und die einzelnen endokrinen Disruptoren allein (ohne H_2O_2) keinen Effekt auf die TPO haben (siehe Kapitel 4.2.1.), war zu erwarten, dass sich in den 0 min-Startwerten der verschiedenen Messungen nur geringe Schwankungen zeigen (siehe Abbildung 4-6). Darum spricht nichts dagegen, die 0 min-Startwerte aller Messungen zusammenzufassen und den Mittelwert daraus 100% zu setzen. Auf diesen 100%-Wert beziehen sich dann alle weiteren 2,5 min-Messwerte. In allen folgenden Säulendiagrammen taucht der Wert als weiße Säule ganz links auf.

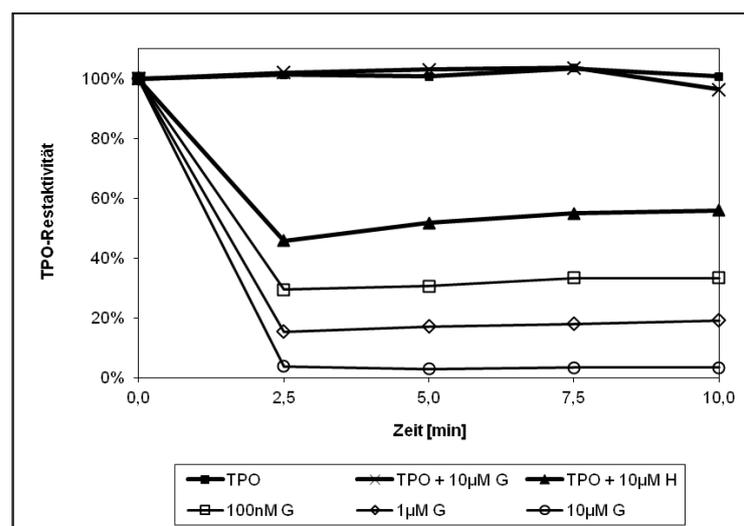


Abb. 4-5: TPO-Inaktivierung durch verschiedene Konzentrationen Genistein (G) in Anwesenheit von 10 μM H_2O_2 (H). Als Kontrollen dienen TPO, TPO + 10 μM G und TPO + 10 μM H. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 Messungen.

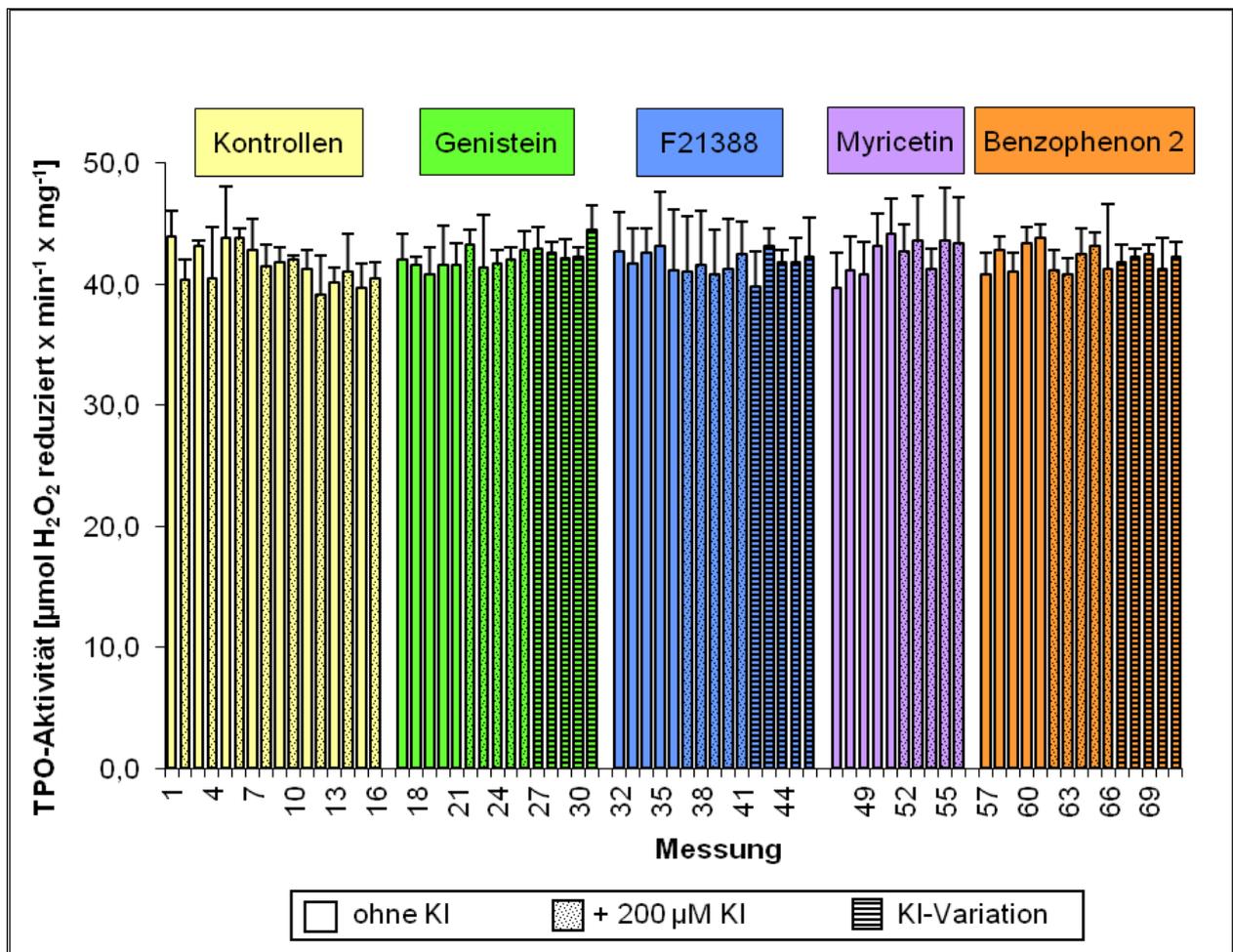


Abb. 4-6: Startwerte (zum Zeitpunkt 0 min, vor Zugabe von H_2O_2) aller durchgeführten Inaktivierungsassays. Dargestellt als Mittelwert + Standardabweichung pro Messansatz.

4.2.1. Kontrollen

Erster Schritt der Betrachtung der Inaktivierung der TPO war die Untersuchung, ob einer der im Inkubationsgefäß enthaltenen Stoffe bereits allein einen Effekt auf die TPO hat. In Abbildung 4-7 erkennt man, dass dies weder bei den jeweils höchsten verwendeten Konzentrationen von Genistein, F2188, Myricetin und Benzophenon 2, noch bei 200 μM KI allein bzw. zusammen mit den endokrinen Disruptoren der Fall ist. Die in den Experimenten verwendete Konzentration von 10 μM H_2O_2 hemmt die TPO um mehr als 50%. Deshalb werden alle Messungen, bei denen 10 μM H_2O_2 enthalten sind, auf diese Kontrolle (TPO + 10 μM H_2O_2) bezogen.

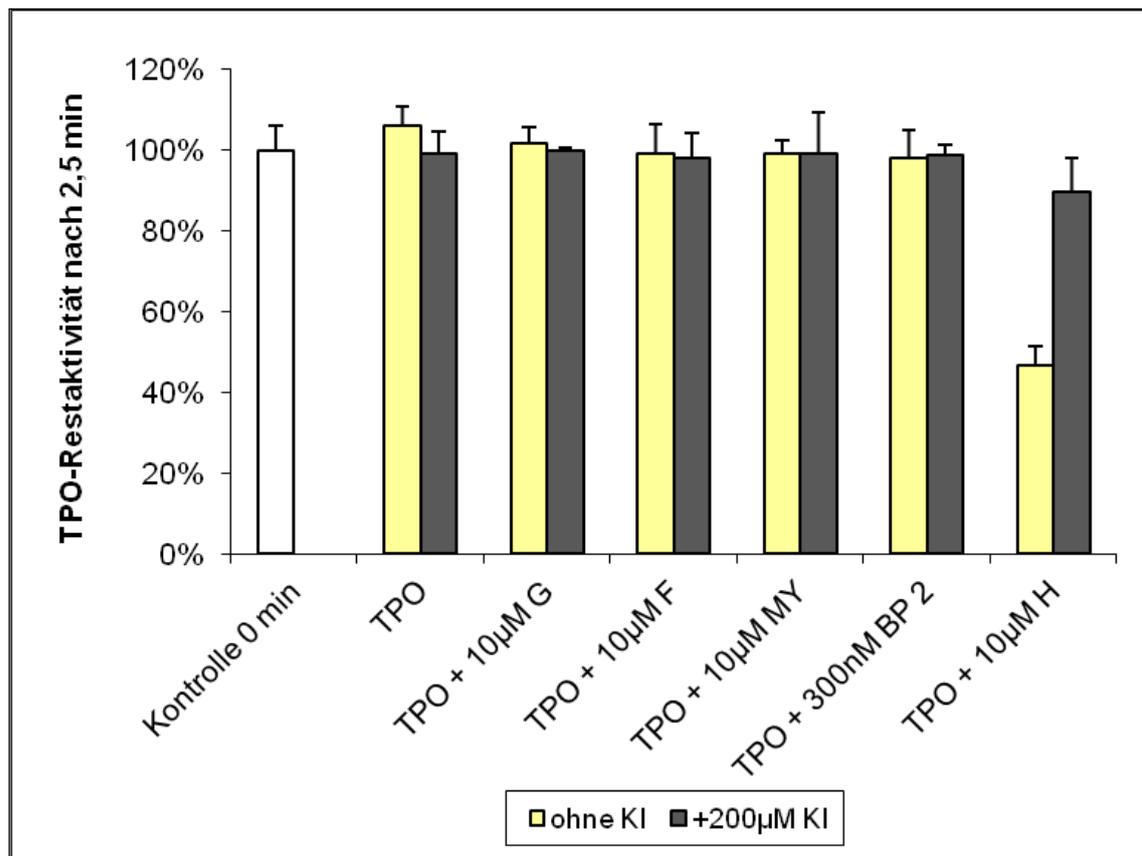


Abb. 4-7: Kontrollen: Effekt der einzelnen im Inaktivierungsassay enthaltenen Stoffe auf die TPO; G = Genistein, F = F21388, MY = Myricetin, BP 2 = Benzophenon 2, H = H₂O₂. Dargestellt als Mittelwert + Standardabweichung aus mindestens 3 Messungen.

4.2.2. Inaktivierung

Betrachtet man nun die Effekte der vier untersuchten endokrinen Disruptoren (siehe Tabelle 4-1), zeigt sich, dass Genistein, F21388 und Benzophenon 2 die TPO konzentrationsabhängig inaktivieren. Genistein und F21388 zeigen dieses Verhalten in vergleichbaren Konzentrationsbereichen, Benzophenon 2 ist auch hier, wie im Inhibierungsassay, potenter und wirkt bereits bei geringeren Konzentrationen. Bei 100 nM ergibt sich für Genistein eine TPO-Restaktivität von 29,2% ($\pm 5,1\%$), für F21388 von 36,4% ($\pm 6,0\%$) und für Benzophenon 2 von 19,3% ($\pm 4,5\%$).

Myricetin zeigt allenfalls in einer Konzentration von 10 µM eine geringe Inaktivierungspotenz. Die Messwerte für 1 µM und 100 nM sind sogar höher als die der Kontrolle (TPO + 10 µM H₂O₂).

Tab. 4-1: Inaktivierung der TPO durch Genistein (G), F21388 (F), Myricetin (MY) und Benzophenon 2 (BP 2) in Anwesenheit von 10 μM H_2O_2 (H). Dargestellt ist die TPO-Restaktivität nach 2,5 min \pm Standardabweichung aus mindestens 3 Messungen. Als Kontrolle mit angegeben ist die TPO-Restaktivität von TPO + 10 μM H_2O_2 .

<u>Genistein</u>	ohne KI	+ 200 μM KI
TPO + 10 μM H	46,8% \pm 4,7%	89,5% \pm 8,5%
100nM G	29,2% \pm 5,1%	91,3% \pm 2,8%
1 μM G	15,3% \pm 4,7%	84,9% \pm 1,0%
10 μM G	3,7% \pm 0,8%	70,3% \pm 3,9%

<u>F21388</u>	ohne KI	+ 200 μM KI
TPO + 10 μM H	46,8% \pm 4,7%	89,5% \pm 8,5%
100nM F	36,4% \pm 6,0%	94,9% \pm 5,2%
1 μM F	23,1% \pm 4,3%	84,7% \pm 7,7%
10 μM F	5,4% \pm 1,6%	51,2% \pm 6,3%

<u>Myricetin</u>	ohne KI	+ 200 μM KI
TPO + 10 μM H	46,8% \pm 4,7%	89,5% \pm 8,5%
100nM MY	50,0% \pm 7,1%	98,1% \pm 6,9%
1 μM MY	57,4% \pm 10,7%	106,4% \pm 12,6%
10 μM MY	41,3% \pm 8,9%	96,3% \pm 5,9%

<u>Benzophenon 2</u>	ohne KI	+ 200 μM KI
TPO + 10 μM H	46,8% \pm 4,7%	89,5% \pm 8,5%
10nM B	39,7% \pm 2,9%	93,4% \pm 9,9%
100nM B	19,3% \pm 4,5%	81,8% \pm 3,4%
300nM B	6,6% \pm 1,9%	59,5% \pm 7,2%

4.2.3. Effekt von KI

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass die Inaktivierung der TPO durch Zugabe von 200 μM KI in den Inkubationsansatz vor dem Start der Reaktion zumindest teilweise verhindert werden kann. Da dieser Effekt bei hohen Konzentrationen der endokrinen Disruptoren im Vergleich zu niedrigen geringer ausgeprägt ist, liegt die Vermutung nahe, dass der Schutz der TPO durch Iodid konzentrationsabhängig erfolgt.

Deshalb beschäftigten sich die folgenden Versuche mit genau dieser Fragestellung. Ausgangspunkt waren dabei jeweils die vorangegangenen Messungen, bei denen die größte Inaktivierung der TPO erreicht wurde, also jeweils mit 10 μM Genistein und F21388 und mit 300 nM Benzophenon 2. Zu diesen Ansätzen wurde nun vor dem Start der Reaktion KI in aufsteigender Konzentration (1 μM , 10 μM , 100 μM und 1 mM) gegeben und der Effekt auf die Inaktivierung der TPO beobachtet. Außerdem wurde untersucht, ob die höchste hier verwendete KI-Konzentration (1 mM) auch dann einen Einfluss auf die Inaktivierung hat, wenn man sie erst spät, das heißt nach dem Start der Reaktion durch H_2O_2 , dazugibt.

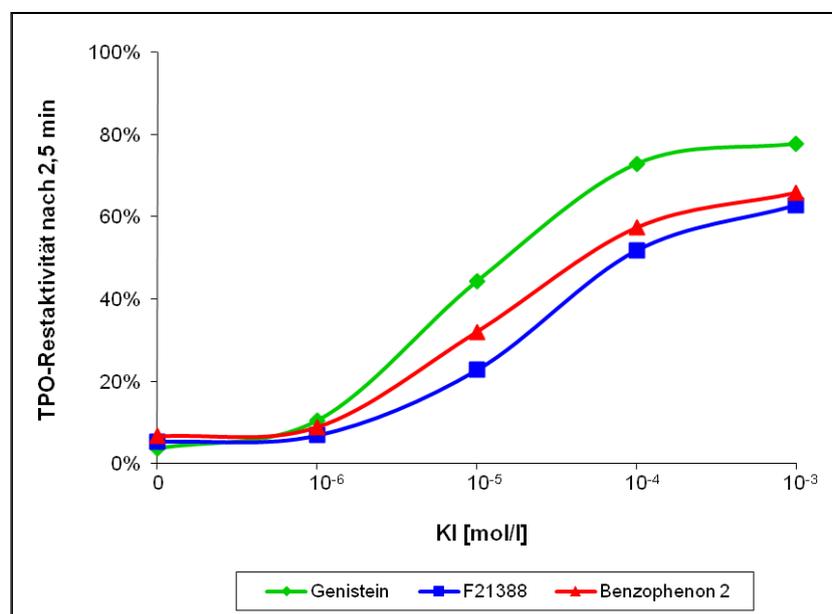


Abb. 4-8: Effekt von verschiedenen Konzentrationen KI auf 10 μM Genistein, 10 μM F21388 oder 300 nM Benzophenon 2. Dargestellt ist die TPO-Restaktivität nach 2,5 min (also 2,5 min nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von 10 μM H_2O_2) als Mittelwert aus mindestens 3 Messungen.

Dabei zeigte sich, dass der Schutzeffekt von KI auf die TPO bei allen drei untersuchten endokrinen Disruptoren wie erwartet konzentrationsabhängig war (siehe Abbildung 4-8). Allerdings konnte auch mit 1 mM KI kein vollständiger Schutz erreicht werden, die TPO-Restaktivitäten betragen bei dieser Konzentration bei Genistein 77,8% ($\pm 5,7\%$), bei F21388 62,9% ($\pm 2,9\%$) und bei Benzophenon 2 65,8% ($\pm 2,5\%$). Außerdem war der Anstieg der Restaktivität bei der letzten Verzehnfachung der KI-Konzentration von 100 μM auf 1 mM bei allen drei Stoffen deutlich geringer als bei den vorangegangenen

Konzentrationserhöhungen, sodass eine Sättigung dieses Effekts anzunehmen ist. Insgesamt spricht Genistein stärker auf das KI an als die beiden anderen Stoffe.

Der Schutzeffekt durch KI trat allerdings nur dann in nennenswertem Umfang auf, wenn das KI bereits vor dem Start der Reaktion im Inkubationsansatz vorhanden war. Die spätere Zugabe erzeugte allenfalls einen geringen Effekt (siehe Tabelle 4-2). Dabei ist zu beachten, dass das KI beim ersten Versuch bereits zum Zeitpunkt 0 min im Inkubationsansatz vorhanden war, während es im zweiten Versuch erst spät, das heißt nach dem Start der Reaktion durch H₂O₂ und nach Entnahme des 2,5 min-Aliquots, dazugegeben wurde.

Tab. 4-2: Zeitabhängiger Effekt von KI auf die Inaktivierung der TPO durch 10 µM Genistein, 10 µM F21388 oder 300 nM Benzophenon 2. Bei 1 mM KI war das KI bereits zum Zeitpunkt 0 min im Inkubationsansatz vorhanden, bei 1 mM KI (spät) wurde es erst nach Entnahme des 2,5 min Aliquots (also nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von 10 µM H₂O₂) dazugegeben. Dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung aus mindestens 3 Messungen.

Zeit	Genistein 10µM			F21388 10µM			Benzophenon 2 300nM		
	ohne KI	1 mM KI	1 mM KI (spät)	ohne KI	1 mM KI	1 mM KI (spät)	ohne KI	1 mM KI	1 mM KI (spät)
0,0 min	97,5% ± 5,2%	100,8% ± 1,9%	106,2% ± 4,7%	101,7% ± 4,8%	99,7% ± 4,8%	100,8% ± 7,8%	98,0% ± 3,8%	98,5% ± 6,0%	100,8% ± 2,9%
2,5 min	3,7% ± 0,8%	77,7% ± 5,7%	7,9% ± 1,6%	5,4% ± 1,6%	62,8% ± 2,9%	7,3% ± 1,5%	6,6% ± 1,9%	65,8% ± 2,5%	8,8% ± 1,9%
5,0 min	2,9% ± 1,6%	76,9% ± 6,1%	9,1% ± 3,2%	5,0% ± 1,3%	65,6% ± 2,5%	12,9% ± 0,7%	5,9% ± 1,9%	67,8% ± 3,1%	13,2% ± 1,7%

4.2.4. Effekt von H₂O₂

Die letzte Untersuchung beschäftigte sich mit dem inaktivierenden Effekt von H₂O₂ auf die TPO. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen H₂O₂ mit der TPO allein und in Anwesenheit der vier endokrinen Disruptoren inkubiert und wie in den vorangegangenen Experimenten die TPO-Restaktivität nach 2,5 min bestimmt. Außerdem wurde wiederum der Effekt von 200 µM KI auf die Reaktionen untersucht.

Dabei zeigte sich, dass der Effekt von H_2O_2 allein durch die Anwesenheit der endokrinen Disruptoren mit Ausnahme von Myricetin deutlich verstärkt wird. Dabei zeigte F21388 einen insgesamt stärkeren Effekt als die anderen beiden Stoffe. Auch hier zeigte sich der konzentrationsabhängige Schutzeffekt von KI, der bei TPO ohne ED auch bei $10 \mu\text{M}$ H_2O_2 zum nahezu vollständigen Aktivitätserhalt der TPO führte (siehe Tabelle 4-3).

Tab. 4-3: Effekt von H_2O_2 auf die TPO allein und in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ Genistein, F21388, Myricetin oder 300 nM Benzophenon 2 jeweils ohne und mit $200 \mu\text{M}$ KI. Angegeben ist die TPO-Restaktivität nach 2,5 min \pm Standardabweichung aus mindestens 3 Messungen.

H_2O_2	TPO		Genistein 10 μM		F21388 10 μM		Myricetin 10 μM		Benzophenon 2 300 nM	
	ohne KI	mit KI	ohne KI	mit KI	ohne KI	mit KI	ohne KI	mit KI	ohne KI	mit KI
1 μM	95,9% $\pm 5,7\%$	103,3% $\pm 4,4\%$	84,3% $\pm 1,7\%$	97,1% $\pm 2,5\%$	65,0% $\pm 1,0\%$	96,3% $\pm 9,5\%$	91,5% $\pm 5,3\%$	102,5% $\pm 8,6\%$	86,8% $\pm 9,0\%$	94,8% $\pm 1,0\%$
3 μM	81,6% $\pm 5,1\%$	104,7% $\pm 1,9\%$	47,4% $\pm 2,5\%$	93,1% $\pm 11,5\%$	21,1% $\pm 8,4\%$	83,9% $\pm 5,5\%$	80,5% $\pm 7,5\%$	102,5% $\pm 9,2\%$	45,5% $\pm 5,1\%$	86,8% $\pm 4,4\%$
10 μM	46,8% $\pm 4,7\%$	89,5% $\pm 8,5\%$	3,7% $\pm 0,8\%$	70,3% $\pm 3,9\%$	5,4% $\pm 1,6\%$	51,2% $\pm 6,3\%$	41,3% $\pm 8,9\%$	96,3% $\pm 5,9\%$	6,6% $\pm 1,9\%$	59,5% $\pm 7,2\%$

4.3. Vergleich der verschiedenen TPO-Extrakte

Da es sich bei den TPO-Extrakten aus den FTC-238 Zellen um ein künstliches Produkt handelt, war es wichtig festzustellen, ob diese vergleichbare Reaktionen zeigen wie TPO-Extrakte, die aus humanen Schilddrüsen gewonnen wurden.

Für die verschiedenen TPO-Extrakte ergaben sich die in Tabelle 4-4 dargestellten Proteinkonzentrationen und Aktivitäten im TPO-Inhibierungsassay. Dabei zeigte sich, dass sich die spezifischen TPO Aktivitäten pro mg bei den verschiedenen Extrakten deutlich unterschieden. Sie lagen zwischen $24,9 (\pm 2,1) \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ reduziert} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ für SD23 und $50,0 (\pm 2,4) \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ reduziert} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ für SD22.

Bei den Zellextrakten zeigte sich, dass TPO-Ex2 und TPO-Ex3, bei denen die Zellen 3 bis 4 Tage mit Hematin stimuliert worden waren und für eine Präparation jeweils etwa

40 Zellkulturflaschen verwendet wurden, eine vergleichbare Aktivität pro mg Protein aufwiesen, während diese bei TPO-Ex1, bei dem die Zellen nur 2 Tage mit Hematin stimuliert worden waren und für die Präparation 28 Zellkulturflaschen verwendet wurden, deutlich geringer war.

Tab. 4-4: Vergleich der sieben TPO-Extrakte: Proteinkonzentration, im Inhibierungsassay eingesetzte Extrakt- und Proteinmenge und im Inhibierungsassay ohne endokrinen Disruptor erreichte spezifische TPO-Aktivität als $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ reduziert pro Minute und mg Protein (Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens 2 Messungen).

Extrakt	TPO-Ex1	TPO-Ex2	TPO-Ex3	SD21	SD22	SD23	SD24
Proteine [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	3,07	4,73	5,43	1,38	1,21	3,00	1,62
μl eingesetzt	24	12	9	33	36	28	36
μg eingesetzt	73,7	56,8	48,9	45,5	43,6	84,0	58,3
TPO-Aktivität	33,3 $\pm 1,5$	44,1 $\pm 1,4$	45,5 $\pm 4,4$	49,0 $\pm 4,2$	50,0 $\pm 2,4$	24,9 $\pm 2,1$	37,7 $\pm 2,3$

Betrachtet man nun den Effekt von verschiedenen Konzentrationen von Benzophenon 2 im TPO-Inhibierungsassay auf die Extrakte, zeigt sich eine relativ einheitliche Reaktion (siehe Abbildung 4-9). Besonders deutlich wird dies, wenn man die Mittelwerte der drei Zellextrakte mit denen der vier Schilddrüsenextrakte vergleicht (siehe Tabelle 4-5). Dabei fällt auf, dass die Standardabweichung bei den Schilddrüsenextrakten mit 8,4 bis 9,2 deutlich höher ist als bei den Zellextrakten mit 1,5 bis 5,8.

Tab. 4-5: Vergleich des Effekts von verschiedenen Konzentrationen Benzophenon 2 (BP 2) auf die Zell- (TPO1-3) und Schilddrüsenextrakte (SD21-24). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert (\pm Standardabweichung) aus den prozentualen Aktivitäten der verschiedenen Extrakte in jeweils mindestens 2 Einzelmessungen bezogen auf die jeweilige Kontrolle ohne Benzophenon 2.

	<u>100nM BP 2</u>	<u>300nM BP 2</u>	<u>600nM BP 2</u>	<u>1μM BP 2</u>
TPO1-3	89,2% ($\pm 5,8\%$)	62,1% ($\pm 3,2\%$)	38,7% ($\pm 2,9\%$)	20,8% ($\pm 1,5\%$)
SD21-24	82,5% ($\pm 8,4\%$)	60,8% ($\pm 8,7\%$)	38,7% ($\pm 9,9\%$)	21,7% ($\pm 9,2\%$)

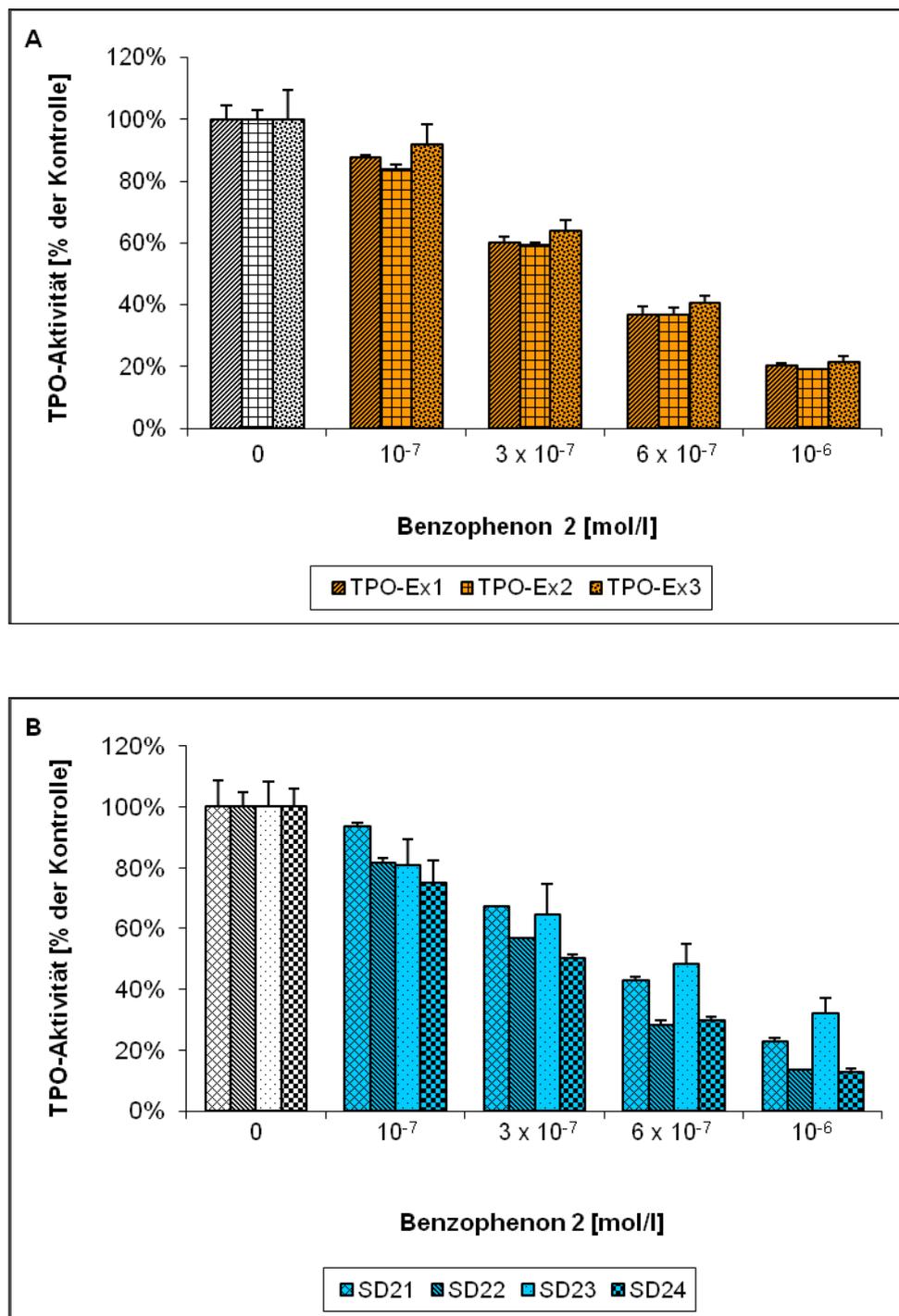


Abb. 4-9: Vergleich der sieben TPO-Extrakte (A: Zellextrakte, B: Schilddrüsenextrakte): Inhibition der TPO im Guaiacol-Oxidationsassay durch verschiedene Konzentrationen von Benzophenon 2. Gezeigt ist die verbleibende TPO-Aktivität in Prozent bezogen auf die Aktivität der Kontrolle (ohne Benzophenon 2) des jeweiligen Extraktes als Mittelwert + Standardabweichung aus mindestens 2 Messungen.

5. Diskussion

Die TPO ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese der Schilddrüsenhormone, indem sie sowohl die Iodierung von Tyrosylresten als auch die Kopplung der dabei entstehenden Iodotyrosylreste im Thyreoglobulin katalysiert, was zur Bildung von T₄ und T₃ führt [Taurog, 2000].

In dieser Arbeit wurden im Rahmen des EURISKED-Projektes (Multi-organic Risk Assessment of Selected Endocrine Disruptors) 6 potentielle endokrine Disruptoren (Apigenin, Benzophenon 2, F21388, Genistein, Myricetin und Xanthohumol) auf ihre Wirkung auf die TPO in einem Inhibierungsassay und in einem Inaktivierungsassay getestet und die protektive Wirkung von Iodid gegen den Aktivitätsverlust der TPO untersucht.

Dazu wurde erstmals ein in vitro Messsystem für die TPO-Aktivität etabliert, das auf einem Extrakt aus stabil mit humaner TPO transfizierten FTC-238 Zellen beruht. Mit diesem rekombinanten System steht jetzt eine dauerhaft verfügbare, reproduzierbare Quelle für humane TPO zur Verfügung, mit der perspektivisch in großem Umfang Stoffe auf ihre potentielle Wirkung auf den Menschen gescreent werden könnten (High Throughput Screening).

5.1. TPO-Inhibierungsassay

5.1.1. Guaiacol-Oxidationsassay

Seit Hosoya et al. vor über 45 Jahren erstmalig die enzymatische Aktivität der TPO mittels des Guaiacol-Oxidationsassays maßen [Hosoya et al., 1962], hat sich diese Methode zu einem weitverbreiteten Verfahren zur Aktivitätsbestimmung von Peroxidasen entwickelt [zum Beispiel Chang & Doerge, 2000, Carvalho et al., 2000, Guo et al., 1998, Niccoli et al., 1997]. An der Messmethode hat sich seit damals wenig verändert. Wurde in den Versuchen in den 60er Jahren 33 mM Guaiacol und 0,27 mM H₂O₂ in einem Reaktionsansatz von 3,03 ml verwendet, so enthielten die Küvetten für die hier beschriebenen Experimente 40 mM Guaiacol und 0,22 mM H₂O₂ in 1 ml.

Die Messung des bernsteinfarbenen Reaktionsproduktes erfolgte photometrisch bei 470 nm über 80 s. Da es sich um eine sehr schnell ablaufende Reaktion handelt, wurde aus

dem linearen Kurvenanteil zwischen 20 und 50 s mittels Lambert-Beerschen Gesetz die TPO-Aktivität berechnet.

Die Reaktion läuft dabei nach folgendem Schema ab [modifiziert nach Capeillere-Blandin 1998] und führt zur Bildung von 3,3'-Dimethoxy-4,4'-dihydroxybiphenyl, das zu 3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenochinon oxidiert wird [siehe Abbildung 5-1].

- (1) Peroxidase + H₂O₂ → Compound I
- (2) Compound I + Guaiacol-OH → Compound II + Guaiacol-O[•]
- (3) Compound II + Guaiacol-OH → Peroxidase + Guaiacol-O[•]
- (4) 2 Guaiacol-O[•] + 2 H⁺ → HO-Guaiacol-Guaiacol-OH

Parallel zur schrittweisen ein-Elektronen-Oxidation des Guaiacols läuft bei der TPO wahrscheinlich außerdem eine 2-Elektronen-Oxidation des Guaiacols durch Compound I ab [Nakamura et al., 1985], die zur Bildung zur Bildung eines Phenoxykations (Guaiacol-O⁺) führt, das mit einem weiteren Guaiacolumolekül zum stabileren Biphenochinon polymerisiert [Capeillere-Blandin 1998].

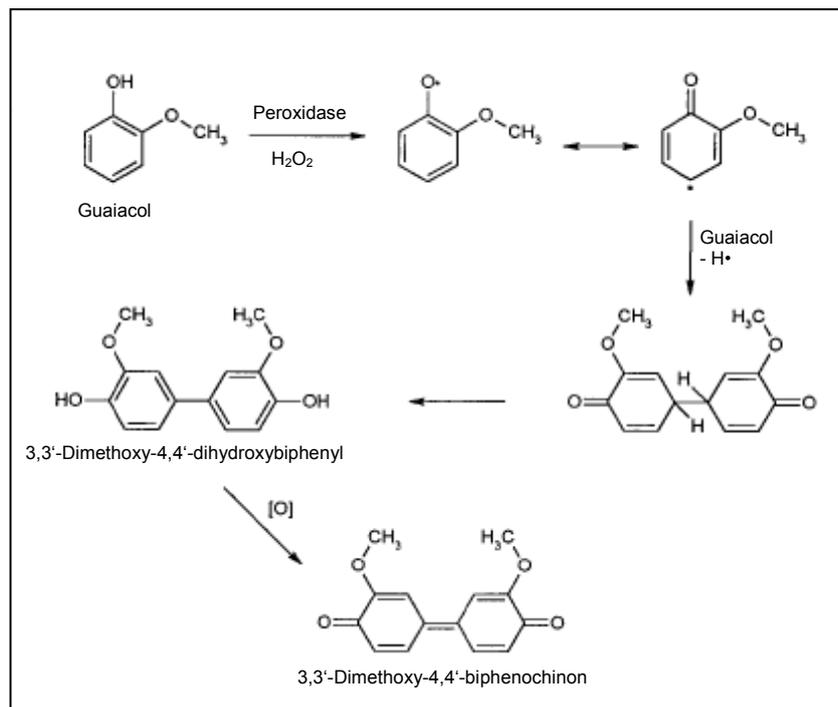


Abb. 5-1: Mechanismus der Bildung des farbigen Guaiacol-Oxidationsproduktes katalysiert durch die TPO [modifiziert nach Doerge et al., 1997]

Es stellt sich an dieser Stelle die Frage, inwieweit dieser Assay die natürliche Funktion der TPO widerspiegelt und ob es nicht sinnvoller wäre, stattdessen mehrere eventuell aufwendigere Methoden zu verwenden, die näher an den physiologischen

Gegebenheiten sind, wie zum Beispiel den Iodid-Oxidationsassay [Hosoya et al., 1985], den Tyrosin-Iodierungsassay [Divi et al., 1997] oder einen Kopplungsassay [Divi et al., 1997].

Der Mechanismus der Guaiacoloroxidation weist deutliche Gemeinsamkeiten sowohl mit der Iodidoxidation als auch mit der Kopplungsreaktion auf. Zum einen läuft die schrittweise ein-Elektronen-Oxidation des Guaiacols ähnlich ab, wie die Oxidation der DIT-Reste bei der Kopplungsreaktion, die die TPO unter physiologischen Bedingungen katalysiert (siehe Abbildung 1-8 in der Einleitung). Zum anderen ähnelt die 2-Elektronen-Oxidation des Guaiacols der unter physiologischen Bedingungen stattfindenden Oxidation von Iodid zum enzymgebundenen Hypiodid, das dann die im Thyreoglobulin gebundenen Tyrosylreste iodiert (siehe Abbildung 1-7 in der Einleitung). Des Weiteren wurde in mehreren Versuchen gezeigt, dass sich in den verschiedenen Assays vergleichbare Werte ergaben. So korrelierten die Werte im Guaiacol-Oxidationsassay gut mit denen aus dem Iodid-Oxidationsassay für menschliche und Schweineschilddrüsen, allerdings weniger gut für erkrankte menschliche Schilddrüsen [Hosoya et al., 1985]. Auch zeigten sich bei Untersuchungen zur Wirkung von Genistein und Daidzein auf die TPO vergleichbare IC_{50} -Werte für die Hemmung von Guaiacol-Oxidation, Iodierung von Tyrosin und Kopplung von iodiertem Casein [Divi et al., 1997]. Ebenfalls vergleichbare IC_{50} -Werte ergaben sich in Hemmstofftests mit verschiedenen Flavonoiden im Guaiacol-Oxidationsassay und im Tyrosin-Iodierungsassay. Eine Ausnahme bildeten hier Naringenin und Myricetin, die in niedrigen Konzentrationen die Guaiacol-Oxidation steigerten [Divi & Doerge, 1996].

Alles in allem handelt es sich beim Guaiacol-Oxidationsassay um ein einfaches, gut reproduzierbares Testsystem, das zu Recht seinen festen Stellenwert in der Aktivitätsbestimmung von Peroxidasen und in Versuchen zu deren Hemmung hat.

Mit diesem Testsystem wurde die Wirkung von 6 endokrinen Disruptoren auf die TPO untersucht.

5.1.2. Die Wirkung der endokrinen Disruptoren

Als Positivkontrolle für diese Versuche diente Genistein, mit dem schon mehrere verschiedene Versuche zur Wirkung auf die TPO durchgeführt wurden. So zeigten Divi et al. dass Genistein in vitro die Guaiacol-Oxidation, die Tyrosin-Iodierung und die

Kopplung von Iodotyrosylresten im Casein und in Thyreoglobulin aus menschlichen Strumen mit vergleichbaren IC_{50} -Werten hemmt. Diese lagen zwischen 0,7 und 3,2 μM [Divi et al., 1997]. Die in dieser Arbeit gemessenen Werte lagen mit einem IC_{50} im Guaiacol-Oxidationsassay von 50,6 μM also etwa um den Faktor 10 höher als die von Divi et al. beschriebenen Werte. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass die verschiedenen TPO-Spezies (Divi arbeitete mit aufgereinigter Schweine-TPO) auch unterschiedlich auf verschiedene Hemmstoffe reagieren. Außerdem könnten auch die etwas unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (Divi verwendete einen Ansatz mit 2,5 mM Guaiacol und 100 μM H_2O_2 , während für die hier beschriebenen Versuche 40 mM Guaiacol und 220 μM H_2O_2 verwendet wurden, da es unter den Reaktionsbedingungen von Divi in unserem System nicht zu verwertbaren Messkurven kam) für diesen Effekt eine Rolle spielen. Für beide Theorien spricht die Tatsache, dass auch die IC_{50} -Werte für MMI und PTU bei Versuchen in unserem Labor mit humaner rekombinanter TPO mit 6,6 bis 9,0 μM für MMI und 105 bis 111 μM für PTU [Schmutzler et al., 2007] höher waren als die in der Literatur für Schweine-TPO beschriebenen Werte von 0,3 μM für MMI und 4,1 μM für PTU, die mit 1 mM Guaiacol und 100 μM H_2O_2 gemessen wurden [Taurog, 1976].

Auch das synthetische Flavonoid F21388, das als T_4 -Analogon entwickelt wurde, und der UV-Filter Benzophenon 2, die beide bisher noch nicht auf ihre Wirkung auf die TPO untersucht wurden, hemmen diese konzentrationsabhängig. Der IC_{50} -Wert liegt bei F21388 mit 37,5 μM etwa im Bereich von Genistein, der von Benzophenon 2 liegt mit 513 nM deutlich darunter. Benzophenon 2 hemmt die TPO damit in deutlich niedrigeren Konzentrationen als die klassischen Thyreostatika MMI und PTU.

Myricetin zeigte ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die TPO mit Werten, die für 50 und 100 μM im Bereich von Genistein und F21388 lagen, allerdings waren die Kurven im Bereich zwischen 5 und 30 μM nicht verwertbar. Betrachtet man die Absorptionsspektren des Reaktionsgemisches vor und nach der Reaktion für eine Reaktion ohne Myricetin und für die Reaktionen mit 10, 20, 30, 50 und 100 μM Myricetin (Abb. 4-4 im Ergebnisteil) so fällt auf, dass in allen Ansätzen die Guaiacolbildung gehemmt wird (kein ausgeprägter Peak bei 470 nm). Der Myricetin-Peak bei 381 nm ist außer bei dem 100 μM Ansatz nach der Reaktion nicht mehr nachweisbar, dafür zeigt sich ein neuer Peak bei etwa 330 nm. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass Myricetin mit der TPO reagiert und dabei zu einem neuen, unbekanntem

Reaktionsprodukt mit einem Absorptionsmaximum bei 330 nm umgewandelt wird. Dabei konkurriert Myricetin entweder mit dem Guaiacol um die TPO oder es kommt durch diese Reaktion zur Inaktivierung der TPO, was in beiden Fällen die gehemmte Guaiacol-Oxidation erklären würde.

Divi et al. zeigten bereits, dass Myricetin einen hemmenden Effekt auf die TPO hat [Divi & Doerge, 1996]. In den mit aufgereinigter Schweine-TPO durchgeführten Versuchen ergab sich im Tyrosin-Iodierungsassay ein IC_{50} -Wert von 0,6 μ M. Sie beschrieben außerdem, dass niedrige Konzentrationen von Myricetin (<10 μ M) die Guaiacol-Oxidation steigern. Dieser Effekt konnte in den hier beschriebenen Versuchen nicht beobachtet werden. Ob die Ursache dafür bei den verschiedenen TPO-Spezies oder den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (Divi et al. maßen bei pH 7,0) liegt, bleibt offen. Als Erklärung für die gesteigerte Guaiacol-Oxidation zeigen Divi et al. ein Schema, nach dem Myricetin bevorzugt im Vergleich zum Guaiacol durch Compound I oder II zum Phenoxylradikal oxidiert wird. Dieses Radikal spaltet ein Wasserstoffatom vom Guaiacol ab, so dass ein Guaiacolradikal entsteht, das dann mit einem weiteren Guaiacolradikal zum nachweisbaren Dimer reagiert (siehe Abbildung 5-1). Da das Flavonoid im Verhältnis schneller umgesetzt wird als das Guaiacol, kommt es zur Steigerung der Guaiacol-Oxidation [Divi & Doerge, 1996]. Warum es allerdings bei höheren Myricetinkonzentrationen zur Hemmung der TPO kommt, erklärt dieses Schema nicht.

Im TPO-Inhibierungsassay zeigte Xanthohumol keinen und Apigenin allenfalls in höheren Konzentrationen (100, 50 und 10 μ M) einen geringen Effekt auf die TPO. Letzteres steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Sartelet et al., die eine deutliche Hemmung der TPO durch Apigenin beobachten konnten. Allerdings verwendeten sie einen zellgebundenen TPO-Assay, bei dem wiederhergestellte Schilddrüsenfollikel aus Schweineschilddrüsenzellen (RTFs) für 45 min mit dem Hemmstoff inkubiert wurden und anschließend die Fähigkeit zur Iodierung von BSA getestet wurde [Sartelet et al., 1996]. Es lässt sich also nicht ausschließen, dass nicht Apigenin sondern eines seiner intrazellulären Abbauprodukte für den inhibitorischen Effekt auf die TPO verantwortlich ist. In diesem Fall wäre der „physiologischer“ Assay dem hier verwendeten einfachen Guaiacol-Oxidationsassay deutlich überlegen. Allerdings könnte es sich bei dem beschriebenen Effekt auch um eine speziesspezifische Wirkung von Apigenin handeln, wie sie auch schon bei anderen Hemmstoffen beobachtet wurde (siehe Kapitel 5.3.).

5.2. TPO-Inaktivierungsassay

5.2.1. Methodische Überlegungen

Als nächstes wurden die 4 Stoffe, die im Guaiacol-Oxidationsassay eine deutliche Hemmung der TPO zeigten (Genistein, F21388, Myricetin und Benzophenon 2), im TPO-Inaktivierungsassay untersucht. Ausgangspunkt für diese Experimente war ein Versuch von Chang et al., der die Wirkung von Genistein auf Ratten-TPO (rTPO) untersuchte. Dazu inkubierten sie die TPO für 12 min mit unterschiedlichen Konzentrationen Genistein und 100 nM H₂O₂ in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer bei einem pH von 7,0. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von H₂O₂ gestartet und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 100 µl aus dem Reaktionsgemisch entnommen und mittels Guaiacol-Oxidationsassay (mit 5 mM Guaiacol, 500 µM H₂O₂ in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0) die TPO-Aktivität bestimmt [Chang & Doerge, 2000].

Um für die in dieser Arbeit verwendeten Extrakte aus FTC-238/TPO verwertbare Kurven zu erhalten, mussten die Reaktionsbedingungen für den Inaktivierungsassay modifiziert werden, so dass hier die humane rekombinante TPO für 10 min mit den endokrinen Disruptoren in unterschiedlichen Konzentrationen und H₂O₂ zwischen 100 nM und 10 µM in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer bei einem pH von 7,4 inkubiert wurde. Die Bestimmung der TPO-Aktivität erfolgte mit dem Guaiacol-Oxidationsassay unter den gleichen Bedingungen wie für die Versuche zur TPO-Inhibierung (40 mM Guaiacol, 220 µM H₂O₂ in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4).

Vergleicht man den Reaktionsablauf mit dem aus dem Originalexperiment so fällt auf, dass dort die Reaktion deutlich langsamer abläuft, während in den hier beschriebenen Versuchen keine Aktivitätsabnahme nach der ersten Messung nach 2,5 min zu beobachten ist (siehe Abbildung 5-2). Als mögliche Ursache hierfür kommen sowohl die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (insbesondere die höhere Konzentration von H₂O₂), die unterschiedlichen TPO-Spezies oder die Unterschiede in der eingesetzten TPO-Menge (Chang et al. verwendeten 80 µg Protein mit einer spezifischen Aktivität von 2 Au*min⁻¹*mg Protein⁻¹, diese Versuche wurden mit 325,8 µg Protein mit einer spezifischen Aktivität von 2,42 Au *min⁻¹*mg Protein⁻¹ durchgeführt) in Frage.

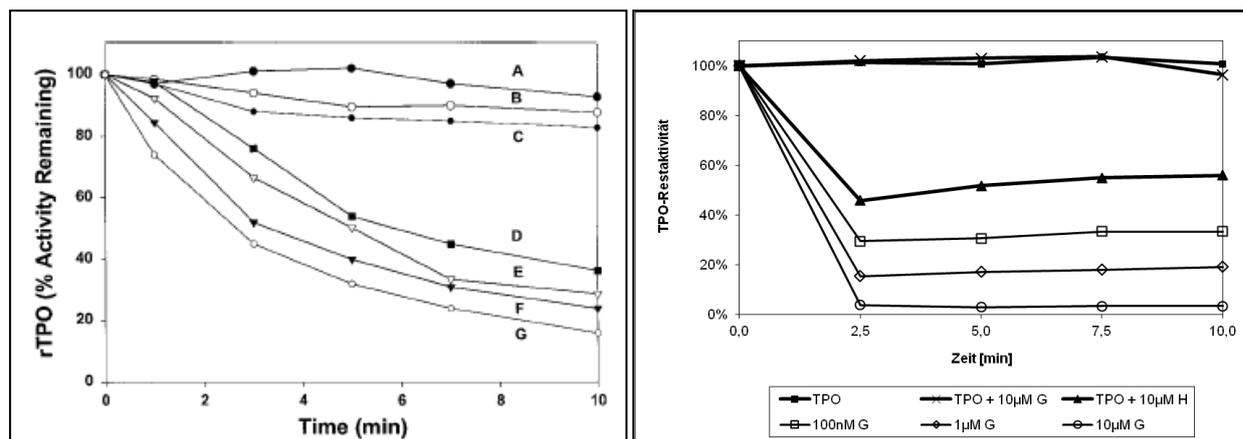


Abb. 5-2: TPO-Inaktivierungsassay – Vergleich der Kurven der Originalversuche von Chang et al. mit denen dieser Arbeit.

Links die Ergebnisse der Originalversuche unter den oben beschriebenen Bedingungen mit A Kontrolle (rTPO), B rTPO + H₂O₂, C rTPO + 1000 nM Genistein, D rTPO + H₂O₂ + 10 nM Genistein, E rTPO + H₂O₂ + 50 nM Genistein, F rTPO + H₂O₂ + 100 nM Genistein, G rTPO + H₂O₂ + 1000 nM Genistein [Abbildung aus Chang & Doerge, 2000].

Rechts die Ergebnisse dieser Arbeit unter den oben beschriebenen Bedingungen für verschiedene Konzentrationen Genistein (G) in Anwesenheit von 10 µM H₂O₂ (H), als Kontrollen dienen TPO, TPO + 10 µM G und TPO + 10 µM H

5.2.2. Effekt von H₂O₂

Während der Kontrollversuche, in denen die im Inkubationsansatz vorhandenen Stoffe in der jeweils höchsten verwendeten Konzentration einzeln auf ihre Wirkung auf die TPO untersucht wurden, fiel auf, dass einzig H₂O₂ einen deutlichen hemmenden Effekt aufwies. So betrug die TPO-Restaktivität 2,5 min nach Zugabe von 10 µM H₂O₂ noch 46,8%. Die Hemmung der TPO durch H₂O₂ ist konzentrationsabhängig und bei einer Konzentration von 1 µM praktisch nicht mehr nachweisbar.

In den Originalexperimenten von Chang et al. [Chang & Doerge, 2000] wird dieser Effekt nicht beschrieben (siehe auch Abbildung 5-2), allerdings betrug die H₂O₂-Konzentration im Inkubationsansatz lediglich 100 nM und lag damit in einem Bereich, in dem auch bei den hier beschriebenen Versuchen keine Hemmwirkung des H₂O₂ beobachtet wurde.

Auch Divi et al. erfassten bei ihren Versuchen zur Inaktivierung von aufgereinigter Schweine-TPO durch verschiedene Flavonoide keine Hemmwirkung von 200 µM H₂O₂ auf 1 µM TPO nach 4 Minuten Inkubation [Divi & Doerge, 1996]. Als mögliche Ursache

für diese Diskrepanz kommen sowohl die verschiedenen TPO-Spezies, die unterschiedlichen eingesetzten TPO-Mengen als auch die verschiedenen Messmethoden (Divi et al. bestimmten die TPO-Restaktivität mittels Tyrosin-Iodierungsassay) in Frage. Allerdings zeigten Divi et al. in ihren Versuchen am Beispiel von Naringenin, dass eine Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration bei gleichbleibender Flavonoidkonzentration zu einer gesteigerten Inaktivierung der TPO führt [Divi & Doerge, 1996] – ein Effekt, der auch in den hier beschriebenen Versuchen zu beobachten war.

Als mögliche Erklärung für die inaktivierende Wirkung von H_2O_2 kommt die Tatsache in Betracht, dass die bei der Reaktion der TPO mit H_2O_2 entstehende enzymatisch aktive Π -Radikalform der TPO in Abwesenheit eines oxidierbaren Substrates (zum Beispiel Iodid oder Guaiacol) schnell zur inaktiven Proteinradikalform isomerisiert [Taurog et al., 1996]. Dies würde auch erklären, warum die inaktivierende Wirkung von H_2O_2 durch die Zugabe von 200 μM KI nahezu komplett aufgehoben wird. Es erklärt allerdings nicht, warum der hemmende Effekt von H_2O_2 in den anderen beschriebenen Versuchen nicht beobachtet wurde.

Eine andere mögliche Erklärung geht auf die Beobachtung zurück, dass sich die TPO in Anwesenheit eines H_2O_2 -Überschusses in die enzymatisch inaktive Compound III (Oxyperoxidase) umwandelt [Virion et al., 1985]. In den von Virion et al. durchgeführten Versuchen kam es nach der Zugabe von einer äquimolaren Menge von H_2O_2 zu 4,6 μM Schweine-TPO zur Bildung einer relativ stabilen Form der TPO, die in der Lage war die Kopplungsreaktion, nicht aber die Iodierung zu katalysieren (Compound II). Nach weiterer Zugabe von 28 μM H_2O_2 zu Compound II entstand eine enzymatisch inaktive Form der TPO, Compound III. Bei der von Virion et al. als Compound II bezeichneten Form handelt es sich nach deren Aussage nicht um die klassische Compound II, die eine Oxidationsstufe über der nativen TPO liegt, sondern um eine andere Form der Compound I, zwei Oxidationsstufen über der nativen TPO, bei der zwei Elektronen zum Apoprotein verlagert sind – also um die Form der TPO, die laut Taurog et al. als Proteinradikalform der TPO Compound I bezeichnet wird [Taurog et al., 1996].

Vergleichbare Daten wie Virion et al. erhoben Ohtaki et al., die nach der Zugabe von 20 μM H_2O_2 zu 1,7 μM Schweine-TPO photometrisch die Entstehung von Compound II und nach Zugabe von 200 μM H_2O_2 zu Compound II die Bildung von Compound III beobachteten [Ohtaki et al., 1985].

Da in den Versuchen zu der hier vorgelegten Arbeit keine Konzentrationsbestimmung der TPO durchgeführt wurde, lässt sich an dieser Stelle nicht beurteilen, ob die im Inaktivierungsassay vorhandene Menge an H_2O_2 die Menge an TPO in dem Maße übersteigt, dass die Entstehung von Compound III wahrscheinlich ist und die TPO-Inaktivierung erklärt.

Die Konzentrationsbestimmung der TPO kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. In dieser Arbeit wurde lediglich die Proteinbestimmung mit der Methode nach Bradford durchgeführt (siehe Abschnitt Material und Methoden), die neben der TPO auch alle anderen in der Membranfraktion enthaltenen Proteine erfasst und deshalb nur einen sehr groben Anhaltspunkt für die enthaltene TPO-Menge liefert.

Eine andere Möglichkeit wäre die Erstellung einer Eichkurve mit kommerzieller gereinigter humaner TPO und einem spezifischen TPO-Antikörper, anhand derer die TPO-Konzentration in den hier präparierten Extrakten bestimmt werden könnte. Allerdings besteht hier die Gefahr, dass die im Extrakt außer der TPO enthaltenen Proteine mit der Reaktion interagieren. Ein weiteres Problem besteht darin, dass diese Methode nicht zwischen TPO-Protein mit und ohne eingebautem Häm unterscheidet, was für quantitative Tests und stöchiometrische Überlegungen notwendig wäre.

Ein weitere Alternative wäre die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung wie bei Ohtaki et al. [Ohtaki et al., 1982] mit einem Extinktionskoeffizienten von $114 \text{ L} \times \text{mMol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bei 413 nm. Als Maß für den Hämgehalt könnte dabei das Verhältnis der Absorption bei 410 und 280 nm dienen (A_{410}/A_{280}). Es gibt allerdings Hinweise, dass dabei auch enzymatisch nicht aktive TPO-Moleküle mit nicht korrekt gebundenem Häm mit bestimmt werden [Guo et al., 1998].

Da es in dieser Arbeit hauptsächlich um die Etablierung des TPO-Assays mit humaner rekombinanter TPO zum Screening von endokrinen Disruptoren und nicht um stöchiometrische Untersuchungen ging, wurde auf eine Konzentrationsbestimmung der TPO verzichtet und lediglich die einfache Methode der Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

5.2.3. Die endokrinen Disruptoren

Da die Originalversuche, die die Grundlage für diese Experimente bildeten mit Genistein durchgeführt wurden, diente diese Substanz wie im Inhibierungsassay als Positivkontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass Genistein, obwohl es allein keinen Effekt auf die TPO hat, in Anwesenheit von H_2O_2 diese konzentrationsabhängig inaktiviert. Dabei ergab sich bei der Inkubation von $1 \mu\text{M}$ Genistein und $10 \mu\text{M}$ H_2O_2 nach 2,5 min eine TPO-Restaktivität von $15,3 \pm 4,7 \%$. Diese Werte sind vergleichbar mit denen aus den Originalversuchen, wo die TPO-Restaktivität bei Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ Genistein und 100 nM H_2O_2 nach 2,5 min ca. 45% und nach 10 min ca. 15% betrug [Chang & Doerge, 2000]. In derselben Publikation beschreiben Chang und Doerge außerdem die Inaktivierung verschiedener anderer TPO-Spezies 5 min nach Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Genistein und $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Dabei ergaben sich für Schweine-TPO ein Aktivitätsverlust von $40 \pm 6\%$, für menschliche TPO von $62 \pm 3\%$ und für Ratten-TPO von $66 \pm 7\%$.

Vergleichbare Werte präsentieren auch Divi et al. in ihren Versuchen mit menschlicher TPO aus Strumen. Auch hier zeigte sich eine zeit- und konzentrationsabhängige (sowohl für Genistein als auch für H_2O_2) Inaktivierung der TPO. Nach Inkubation über 4 min mit $50 \mu\text{M}$ Genistein und $200 \mu\text{M}$ H_2O_2 ergab sich im Tyrosin-Iodierungsassay eine TPO-Restaktivität von $29 \pm 7 \%$. Durch die Zugabe von $150 \mu\text{M}$ Iodid zum Inkubationsansatz konnte die TPO vollständig vor der Inaktivierung geschützt werden [Divi et al., 1997]. Ein entsprechender Effekt war auch in den hier beschriebenen Versuchen zu beobachten (siehe Kapitel 5.2.4).

Doerge und Chang postulieren für die Hemmung beziehungsweise Inaktivierung der TPO durch Genistein den in Abbildung 5-3 dargestellten Mechanismus. Dabei kommt es in Abwesenheit von Iodid zur Suizidinaktivierung der TPO mit dem irreversiblen Verlust der Iodierungs- und Kopplungsfähigkeit. Dabei reagiert Genistein mit Compound I, was zur Bildung eines reaktiven Genisteinradikals und der Radikalform von Compound II führt. Diese beiden reagieren miteinander und wahrscheinlich entsteht durch kovalente Bindung des Genisteinradikals an einen Aminosäurerest im aktiven Zentrum des Enzyms die inaktive TPO. Ist Iodid vorhanden, kommt es zur kompetitiven Hemmung der Iodierung von Tyrosylresten durch die bevorzugte Bildung von iodiertem Genistein durch die TPO-Iodierungsspezies. Die Folge ist ein reversibler

Aktivitätsverlust der TPO [Doerge & Chang, 2002]. Dabei werden pro Genisteinmolekül bis zur drei Iodatome gebunden, wahrscheinlich zwei davon am Resorcinring und eins am Phenolring [Divi et al., 1997].

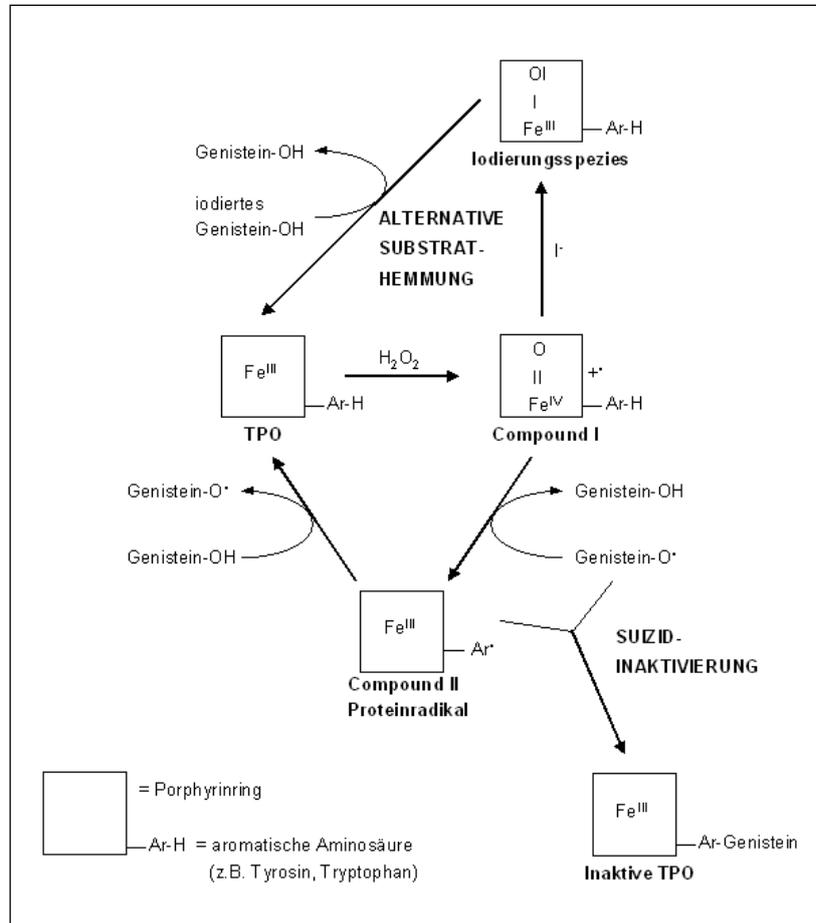


Abb. 5-3: Wirkungsmechanismus für die Hemmung der TPO durch Genistein (modifiziert nach Doerge & Chang, 2002): Erklärung im Text

Auch das synthetische Flavonoid F21388, das als T₄-Analogon entwickelt wurde und T₄ aus der Bindung an Transthyretin verdrängt [Köhrle et al., 1989], inaktiviert die TPO konzentrationsabhängig etwa im selben Umfang wie Genistein. Ob dies durch den gleichen Mechanismus geschieht und ob F21388 auch in vivo auf die TPO wirkt, muss noch geklärt werden. Allerdings ist F21388 am C-Ring bereits dibromiert und kann deshalb im Vergleich mit Genistein dort nicht iodiert werden, aber am A-Ring existieren 2 potentielle Iodbindungsstellen in ortho-Position zur OH-Gruppe.

Wie schon im Inhibierungsassay erwies sich Benzophenon 2 auch im Inaktivierungsassay als potentester Hemmstoff der TPO. Es bewirkte in Anwesenheit von 10 µM H₂O₂ bereits in einer Konzentration von 100 nM eine TPO-Restaktivität von

19,3 ± 4,5% und war damit etwa 10-mal so wirksam wie Genistein. Die Inaktivierung der TPO durch Benzophenon 2 hängt möglicherweise mit dem Vorhandensein der 2 Resorcingruppen in diesem Molekül zusammen, denn es konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl Resorcin selbst [Divi & Doerge 1994] als auch andere Flavonoide mit Resorcingruppen (zum Beispiel Genistein) in der Lage sind, die TPO zu inaktivieren. Es scheint also plausibel, dass Benzophenon 2 über einen vergleichbaren Mechanismus wirkt und wie Genistein am Resorcinring iodiert wird. Allerdings müssen noch andere strukturelle Eigenschaften abgesehen von Resorcinring bei der Wirkung als TPO-Hemmstoff eine Rolle spielen, denn Apigenin weist zwar einen Resorcinring auf, hemmt die TPO zumindest in den hier beschriebenen Versuchen aber nicht.

Da Myricetin ebenfalls einen Resorcinring besitzt und im TPO-Inhibierungsassay eine deutliche Hemmung der TPO zeigte, war zu erwarten, dass es die TPO auch inaktiviert. Dies ist allerdings nicht der Fall. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Divi und Doerge in ihren Versuchen mit Schweine-TPO. Sie inkubierten diese mit 150 µM Myricetin für 1 min und starteten dann die Reaktion durch Zugabe von 200 µM H₂O₂. Nach 3 min wurde die TPO-Restaktivität im Tyrosin-Iodierungsassay bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die TPO nur zu 8,9 ± 1,02% inaktiviert worden war. Bei anderen Flavonoiden, die die TPO deutlicher inaktivierten (zum Beispiel Naringenin) wurde eine Veränderung im Absorptionsspektrum der inaktivierten im Vergleich zur nativen TPO beobachtet und als Zeichen einer kovalenten Bindung des Flavonoidradikals an Compound II gewertet. Diese Veränderung im Absorptionsspektrum trat bei Myricetin nicht auf, woraus geschlossen wurde, dass Myricetin die TPO reversibel hemmt, indem es mit Compound I und II, nicht aber mit der nativen TPO oder der TPO-Iodierungsspezies interagiert [Divi & Doerge, 1996].

5.2.4. Effekt von KI

Die Zugabe von Kaliumiodid zum Inkubationsansatz verhindert zumindest teilweise die Inaktivierung der TPO durch Genistein, F21388 und Benzophenon 2 in Anwesenheit von 10 µM H₂O₂. Dieser schützende Effekt war von der Konzentration des Kaliumiodids abhängig und bei Genistein etwas ausgeprägter als bei F21388 und Benzophenon 2. So betrug die TPO-Restaktivität nach Zugabe von 1 mM KI zur jeweils höchsten

Konzentration des endokrinen Disruptors bei Genistein $77,8 \pm 5,7\%$, bei F21388 $62,9 \pm 2,9\%$ und bei Benzophenon 2 $65,8 \pm 2,5\%$.

Anhand des Kurvenverlaufs in Abbildung 4-8 (im Ergebnisteil) ist davon auszugehen, dass dieser Effekt einer Sättigung unterliegt, die im Bereich von 1 mM KI erreicht ist.

Ebenfalls einen partiellen Schutz der TPO vor Inaktivierung beobachteten Divi und Doerge bei der Inkubation von TPO mit 150 μM Kaempferol, 200 μM H_2O_2 und 5 mM Iodid. Nach 4 min zeigte sich im Tyrosin-Iodierungsassay eine TPO-Restaktivität von $63,8 \pm 8,46\%$ der Kontrolle, nachdem die TPO-Restaktivität ohne Iodid $18,2 \pm 8,96\%$ betrug [Divi & Doerge, 1996].

Einen vollständigen Schutz der TPO vor Inaktivierung bei Inkubation mit 50 μM Genistein und 200 μM H_2O_2 beschreiben Divi et al. für 150 μM Iodid [Divi et al., 1997].

Eine Erklärung für den schützenden Effekt von Iodid ist eventuell dessen Fähigkeit, die native Form der TPO zu regenerieren und dadurch die Π -Radikalform vor der irreversiblen Isomerisierung zur inaktiven Proteinradikalform von Compound I zu bewahren [Taurog et al., 1996]. Des Weiteren kommt es bei Anwesenheit von Iodid zur bevorzugten Iodierung des endokrinen Disruptors, was wiederum dazu führt, dass die native TPO regeneriert wird und es nicht zur Entstehung des Proteinradikals von Compound II und des Radikals des Hemmstoffes kommt, die dann zur inaktiven TPO miteinander reagieren können (siehe Abbildung 5-3).

Dass der schützende Effekt von Iodid nur zu beobachten ist, wenn es vor dem Start der Reaktion mit H_2O_2 zum Inkubationsansatz gegeben wird, spricht dafür, dass die Isomerisierung der Π -Radikalform zur Proteinradikalform von Compound I beziehungsweise die irreversible Inaktivierung der TPO durch Bindung des Hemmstoffradikals schnell ablaufende, irreversible Reaktionen sind.

Auch im Inkubationsansatz mit 10 μM H_2O_2 ohne endokrinen Disruptor hebt die Zugabe von 200 μM Kaliumiodid die inaktivierende Wirkung von H_2O_2 nahezu komplett auf. Ursache dafür könnte neben der oben angeführten Erklärung außerdem die Tatsache sein, dass die TPO in Anwesenheit von Iodid in der Lage ist H_2O_2 abzubauen [Magnusson et al., 1984].

Zusammenfassend kann man sagen, dass von den untersuchten Stoffen Genistein, F21388, Benzophenon 2 und Myricetin die TPO in vitro hemmen.

Dabei kommt es bei den drei zuerst genannten Stoffen konzentrationsabhängig zu einer Inaktivierung der TPO wahrscheinlich durch kovalente Bindung des endokrinen Disruptors an das Enzym. Ist im Reaktionsansatz Iodid vorhanden, wird die Inaktivierung der TPO vermutlich durch Iodierung der endokrinen Disruptoren verhindert. Unter physiologischen Bedingungen spielt der schützende Effekt von Iodid voraussichtlich dann eine Rolle, wenn aufgrund von Iodmangel die potentiell schädliche Wirkung der endokrinen Disruptoren verstärkt wird.

Für Myricetin konnte keine TPO-Inaktivierung nachgewiesen werden, was für eine reversible Hemmung der TPO spricht. Der genaue Mechanismus ist hier noch unbekannt.

5.3. Die TPO-Extrakte

In dieser Arbeit wurden TPO-Extrakte verwendet, die aus stabil mit humaner TPO transfizierten FTC-238 Zellen gewonnen wurden, um ein Messsystem zu schaffen, mit dem Inhibitordaten gewonnen werden können, die Relevanz für die menschliche TPO und damit für die menschliche Gesundheit haben. Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung von unterschiedlichen Stoffen auf die TPO wurden bisher überwiegend mit TPO-Extrakten durchgeführt, die entweder aus Schweineschilddrüsen [zum Beispiel Divi et al., 1997, Divi & Doerge, 1996, Taurog, 1976, Taurog et al., 1994b, Taurog et al., 1995], Rattenschilddrüsen [Chang & Doerge, 2000] oder aus menschlichen Strumen stammten [zum Beispiel Carvalho et al., 2000, Divi et al., 1997, Ferreira et al., 2000].

Ein Problem bei der Verwendung von TPO aus Tierschilddrüsen stellt die Tatsache dar, dass sich die TPO-Moleküle von Spezies zu Spezies unterscheiden. So besteht die Schweine-TPO beispielsweise aus 926 Aminosäuren [Magnusson et al., 1987], während die humane TPO 933 Aminosäuren aufweist [Kimura et al., 1987]. Dieser, wenn auch geringe Unterschied, könnte theoretisch dazu führen, dass die beiden Moleküle unterschiedlich auf bestimmte Hemmstoffe reagieren. Hinweise für speziesspezifische Effekte von Inhibitoren auf die TPO gibt es zum Beispiel aus Versuchen mit Genistein, das im Inaktivierungsassay mit Schweine-TPO einen Aktivitätsverlust von $40 \pm 6\%$ und mit humaner TPO von $62 \pm 3\%$ erzeugte [Chang & Doerge, 2000]. Des Weiteren ergaben auch die Versuche in unserem Labor zur

Wirkung der klassischen Thyreostatika PTU und MMI auf die humane rekombinante TPO und TPO aus Strumaproben im Guaiacol-Oxidationsassay andere IC_{50} -Werte, als in der Literatur für Schweine-TPO beschrieben sind. Die IC_{50} -Werte lagen für die humane rekombinante TPO zwischen 6,6 und 9,0 μM für MMI und zwischen 105 und 111 μM für PTU und bei den Strumaproben zwischen 8,2 und 11,1 μM für MMI und 98 und 212 μM für PTU [Schmutzler et al., 2007], während für Schweine-TPO IC_{50} -Werte von 0,3 μM für MMI und 4,1 μM für PTU beschrieben wurden [Taurog, 1976]. Allerdings wurden die beschriebenen Versuche auch mit unterschiedlichen Konzentrationen der Reaktionspartner durchgeführt, die natürlich auch einen Effekt auf die IC_{50} -Werte haben, und sind deshalb nur bedingt vergleichbar.

Dass es aber durchaus Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies gibt, zeigt unter anderem die Tatsache, dass sich zwischen Affen- und Ratten-TPO Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber PTU und MMI nachweisen ließen, wobei die Affen-TPO resistenter gegenüber den Hemmstoffen war. Vergleichbare Ergebnisse erbrachten auch in vivo Versuche mit beiden Spezies [Takayama et al., 1986].

Bezüglich der spezifischen Enzym-Aktivität zeigten sich ebenfalls Unterschiede zwischen TPO aus humanen, Schweine- und Rinderschilddrüsen [Hosoya et al., 1985]. Die Werte sind in den untersten Zeilen der Tabelle 5-1 dargestellt.

Tab. 5-1: TPO-Aktivität verschiedener Extraktpräparationen, dargestellt als $\Delta Abs/min/mg$ Protein.

Extrakt-Quelle	TPO-Aktivität	Quelle
rekombinante humane TPO aus FTC-238-Zellen humane TPO aus Strumen	1,85 - 2,48 1,33 - 2,66	diese Arbeit
rekombinante humane TPO aus CHO-Zellklonen humane TPO aus Basedow-Schilddrüsen	3,1 - 4,0 4,6 - 4,7	Kaufman et al., 1989
rekombinante humane TPO aus High Five Insektenzellen humane TPO aus Schilddrüsen	1200 900	Gut et al., 2000
rekombinante humane TPO aus CHO-Zellen	0,77	Bikker et al., 1997
sezernierte rekombinante humane TPO aus CHO-Zellen - nach Stimulation mit 1 mg/l Hematin - nach Stimulation mit 20 mg/l Hematin	3,5 24,0 46,0	Guo et al., 1998
rekombinante humane TPO aus Hep G2 Zellen - nach Aufreinigung mittels Immunoaffinität	0,256 80,8	Kimura et al., 1989b
humane TPO aus gesunden Schilddrüsen TPO aus Schweine-Schilddrüsen TPO aus Rinder-Schilddrüsen	1,797 0,576 0,816	Hosoya et al., 1985

Die Verwendung von menschlichen Strumaprobe für Inhibierungsversuche bringt den großen Vorteil mit sich, dass man mit humaner TPO arbeitet und damit die speziesspezifischen Wirkungen umgehen kann. Ein Nachteil besteht allerdings darin, dass es sich bei Strumaprobe um sehr heterogene Gewebe handelt. So zeigten Moura et al., dass sich die TPO-Aktivität in verschiedenen Strumaprobe und auch an verschiedenen Stellen einer Struma zum Teil deutlich unterscheidet. Auch in normalen Schilddrüsen besteht eine relativ breite Schwankung in der TPO-Aktivität [Moura et al., 1989], so dass es für Screening-Untersuchungen schwierig ist, daraus ein stabiles System zu entwickeln, das reproduzierbare Daten liefert. Außerdem ist es natürlich ethisch nicht vertretbar, gesundes Schilddrüsen Gewebe für ein Screeningverfahren zu entfernen, so dass als Quelle für normales Schilddrüsen Gewebe nur, wie bei Moura et al. beschrieben, Autopsiepräparate zur Verfügung stehen.

Ein weiteres Beispiel für die Heterogenität von Strumaprobe sind die Schwankungen in den oben angegebenen IC_{50} -Werten für MMI und PTU [Schmutzler et al., 2007].

Trotz dieses Problems dienten die Extrakte aus den Strumaprobe in dieser Arbeit als Vergleichsmaterial für die TPO-Extrakte, die aus den transfizierten FTC-238-Zellen gewonnen wurden. Ziel dieses Vergleiches war es, auszuschließen, dass der in den transfizierten Zellen vorhandene TPO-Klon sich in seinen Eigenschaften deutlich von normaler humaner TPO unterscheidet. Anhand der Proteinkonzentration, der spezifischen Aktivität und der Reaktion auf den Inhibitor Benzophenon 2 konnte gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist. Auffällig war dabei, dass es sich bei den Extrakten aus den transfizierten Zellen um ein sehr homogenes System handelt – besonders die Werte der aus annähernd gleich vielen Zellen gewonnenen Extrakte TPO-Ex2 und 3 liegen sehr dicht beieinander. Dieses System erscheint aus diesem Grund sehr gut geeignet, um es als in vitro Screeningverfahren einzusetzen, um in großem Umfang Substanzen auf ihr Potential, die Schilddrüse zu hemmen, zu untersuchen. Es wird aktuell in unserem Labor weiterentwickelt, um es im 96 well Mikrotiterplattenformat zum Screening von nutritiven antikanzerogenen Glukosinolaten einzusetzen.

Obwohl sie bisher noch nicht für Untersuchungen zur Hemmbarkeit der TPO verwendet wurden, gibt es doch Beschreibungen von Extrakten aus rekombinanter TPO aus verschiedenen Zellsystemen. Einen Überblick über einige davon und einen Vergleich mit präparierten Extrakten aus menschlichen oder tierischen Schilddrüsen zeigt Tabelle 5-1, in der die TPO-Aktivität der verschiedenen Extrakte den in dieser Arbeit

gemessenen Aktivitäten gegenüber gestellt wird. Dabei fällt auf, dass die TPO-Aktivität in den verschiedenen Präparationen sehr weit auseinander liegt. Die Ursache hierfür sind sicherlich die unterschiedlichen Methoden, die zur Aufreinigung des Enzyms verwendet wurden. So verwendeten beispielsweise Kaufman et al., die nur gering höhere spezifische TPO-Aktivitäten als in dieser Arbeit beschrieben, zur Präparation Trypsin und Deoxycholat [Kaufman et al., 1989], während die Aufreinigung bei Gut et al. mittels verschiedener chromatographischer Verfahren zu deutlich höheren Enzymaktivitäten führte [Gut et al., 2000].

Die Versuche von Guo et al. beziehungsweise Kimura et al. zeigen, dass sich die TPO-Aktivität in den Extrakten entweder durch Stimulation der Zellen mittels Hematin [Guo et al., 1998] oder durch Aufreinigungsmethoden (in diesem Fall durch Immunoaffinität) [Kimura et al., 1989b] deutlich steigern lassen. Bei Guo et al. handelt es sich dabei um eine Präparation von aufgereinigter, sezernierter TPO. Das hat den Vorteil, dass verschiedene Störfaktoren der enzymatischen Reaktion wie zum Beispiel andere Bindungsstellen für die Liganden, konkurrierende Enzymaktivitäten im Substratumsatz oder Interaktionen mit der Phospholipidmembran reduziert beziehungsweise ausgeschaltet werden. Die durch die Aufreinigung erreichte höhere spezifische Aktivität der TPO ermöglicht dann auch Messungen zur Enzymkinetik. Allerdings handelt es sich bei dieser Methode im Vergleich zu der in dieser Arbeit verwendeten Gewinnung der solubilisierten Membranform der TPO um ein deutlich aufwendigeres Verfahren, das möglicherweise zu einer höheren Variabilität zwischen verschiedenen Enzympräparationen führt.

An den Ergebnissen von Kaufman et al. und von Gut et al. kann man wie an den Ergebnissen aus dieser Arbeit erkennen, dass die Enzymaktivitäten bei gleicher Präparationsmethode für die rekombinanten TPO-Extrakte und die Extrakte aus humanen Schilddrüsen jeweils in vergleichbaren Bereichen liegen. Gut et al. zeigten in ihren Versuchen außerdem, dass die rekombinante humane TPO aus High Five Insektenzellen nicht nur in ihrer enzymatischen Aktivität sondern auch im Licht- und UV-Spektrum und in der Reaktivität mit Autoantikörpern der TPO aus menschlichen Schilddrüsen gleicht [Gut et al., 2000].

5.4. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Lebewesen

Da es sich bei allen durchgeführten Experimenten um Versuche *in vitro* handelt, stellt sich natürlich die Frage, inwieweit die hier gewonnenen Daten auf lebende Organismen und insbesondere auf den Menschen übertragbar sind.

Ein gutes Beispiel dafür ist die bereits relativ gut untersuchte Wirkung von Genistein. Eine wichtige Voraussetzung für die Wirkung eines endokrinen Disruptors *in vivo* ist zum einen dessen Resorption und zum anderen dessen Anreicherung im Zielgewebe, in diesem Fall in der Schilddrüse. In Versuchen mit Ratten konnte gezeigt werden, dass sich chronisch zugeführtes Genistein konzentrationsabhängig in Serum und Schilddrüse nachweisen lässt [Chang et al., 2000]. Da sich auch bei mit Sojamilch ernährten Säuglingen deutlich erhöhte Plasmagenisteinwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen ließen [Setchell et al., 1998], ist es wahrscheinlich, dass Genistein auch beim Menschen die Schilddrüse erreicht. Bei Versuchen mit Ratten hemmte Genistein die TPO auch *in vivo*, ohne dass es trotz eines TPO-Aktivitätsverlustes von bis zu 80% zu einer hypothyreoten Stoffwechsellage kam [Chang & Doerge, 2000]. Da die Ratten in diesem Versuch nicht unter Iodmangel litten und da außerdem gezeigt werden konnte, dass bereits eine geringe Menge Iodid ausreicht, um Ratten vor Strumen aufgrund von Sojakost zu schützen [Kimura et al., 1976], ist davon auszugehen, dass die hemmende Wirkung von Genistein vor allem bei gleichzeitigem Iodmangel von Bedeutung ist. Beim Menschen wurden in alten Fallberichten Strumen bei mit Sojamilch ernährten Kindern geschildert, die sich zurückbildeten, wenn die Ernährung auf Kuhmilch umgestellt wurde. Seit die Hersteller der Soja-Säuglingsnahrung Iod zusetzten, wurden keine Strumafälle mehr beschrieben [Überblick in Chen & Rogan, 2004].

Dass außer einer ausreichenden Iodzufuhr noch andere Umstände eine Rolle bei der Entwicklung einer Hypothyreose durch eine sojareiche Ernährung spielen, zeigt eine Studie, in der 6 von 60 Menschen mit einer latenten Hypothyreose nach 8 Wochen einer hochdosierten Phytoöstrogenaufnahme aus Soja (16 mg pro Tag) trotz ausreichender Iodzufuhr eine manifeste Hypothyreose entwickelten [Sathyapalan et al., 2011].

Diese Darstellungen weisen darauf hin, dass die *in vitro* beobachtete Hemmung der TPO eventuell auch *in vivo* beim Menschen eine Rolle spielen könnte, allerdings gibt es auch Versuche, in denen eine sojahaltige Diät keinen Einfluss auf die

Schilddrüsenhormonwerte hatte. In einer Studie erhielten 18 postmenopausale Frauen eine solche Diät über 93 Tage ohne dass es zu einer Veränderung der T₃-, T₄- und TSH-Werte kam [Duncan et al., 1999]. Vergleichbare Werte ergab ein Versuch mit 35 jungen Männern, bei denen sich unter Sojagabe über 57 Tage die Schilddrüsenwerte nicht signifikant veränderten [Dillingham et al., 2007].

Auch die Einnahme von 54 mg Genistein pro Tag durch 40 postmenopausale Frauen über 3 Jahre zeigte keinen Effekt auf die Serum-Schilddrüsenwerte und die Schilddrüsen-Autoantikörper [Bitto et al., 2010].

In einem Versuch mit 86 Studenten, die über 7 Tage Soja (2 g/kg Körpergewicht) zu sich nahmen, kam es allerdings bei den männlichen Probanden zu einem temporären signifikanten Anstieg der Serum-TSH-Konzentration [Hampl et al., 2008].

Es fehlen also noch weitere Untersuchungen, um zu wissen, in welchem Umfang und unter welchen Bedingungen Genistein auf die humane Schilddrüsenhormonachse wirkt. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass es bei den Effekten der endokrinen Disruptoren je nach Resorptions- und Metabolisierungsrate erhebliche interindividuelle Unterschiede geben kann. So konnten bei 32 prämenopausalen Frauen, die über 3 Menstruationszyklen täglich Sojaisoflavone zu sich nahmen, deutliche Unterschiede in der Menge der im Urin ausgeschiedenen Isoflavonmetabolite und in den dazu korrelierenden antiöstrogenen Effekten auf den Knochenstoffwechsel beobachtet werden [Kwak et al., 2009].

Auch die Unterschiede zwischen Männern und Frauen müssen bei der Betrachtung der Wirkungen der endokrinen Disruptoren berücksichtigt werden. So zeigte sich in einer Metaanalyse kein Effekt von Soja oder Isoflavonen auf die Testosteronkonzentration von Männern [Hamilton-Reeves et al., 2010]. In wieweit sich auch in anderen Organen die östrogene Wirkung von Soja beziehungsweise Genistein zwischen den Geschlechtern unterscheidet, muss noch untersucht werden.

Die Wirkung von Genistein *in vitro*, bei Ratten und beim Menschen ist ein gutes Beispiel dafür, dass es schwierig ist, von *in vitro* auf *in vivo* Daten und von einer Spezies auf die andere zu schließen. Allerdings geben die *in vitro* Daten einen Hinweis, welche Stoffe eventuell auch beim Menschen einen Effekt haben könnten.

Mögliche Grenzen der durchgeführten Versuche zeigt das Beispiel Apigenin, das im Guaiacol-Oxidationsassay die TPO allenfalls gering hemmte, in einem zellgebundenen Assay mit Schweineschilddrüsenfollikeln aber einen deutlichen Effekt zeigte [Sartelet et

al., 1996]. Ob es sich dabei um einen speziesspezifischen Effekt handelt ist offen und müsste noch untersucht werden. Gegen diese Vermutung spricht die Tatsache, dass es Gegenden in Afrika gibt, in denen über die Hälfte der Bevölkerung unter einer Struma leidet [Konde et al., 1994], als deren Ursache neben Iodmangel auch der Konsum von Hirse, die unter anderem 150 mg/kg Apigenin enthält, diskutiert wird [Sartelet et al., 1996].

Sicherlich die interessanteste Substanz bezüglich ihrer Wirkung auf die TPO ist in diesen Versuchen Benzophenon 2, das eine höhere inhibitorische Potenz als die klassischen Thyreostatika PTU und MMI aufweist [Schmutzler et al., 2007]. In wieweit diese Beobachtung Relevanz für die menschliche Gesundheit hat, hängt hauptsächlich davon ab, ob Benzophenon 2 wie Benzophenon 3 [Gonzales et al., 2006] transdermal resorbiert wird und ob es dann die Schilddrüse erreicht. Obwohl bei Ratten gezeigt werden konnte, dass Benzophenon 2 nach oraler Aufnahme relativ schnell metabolisiert und ausgeschieden wird [Schlecht et al., 2008], ist eine Wirkung auf die Schilddrüse nicht ausgeschlossen. In Versuchen mit Ratten, denen über 5 Tage oral Benzophenon 2 zugeführt wurde, zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der Serum-T₄-Spiegel und ein Anstieg des TSH. Die Serum-T₃-Spiegel und die TPO-Aktivität in den entnommenen Schilddrüsen waren nicht beeinträchtigt [Schmutzler et al., 2007]. Für den Menschen steht der Nachweis einer transdermalen Resorption und möglicher Interaktionen mit der Schilddrüsenhormonachse noch aus.

5.5. Fehlerbetrachtung

Bei dem der gesamten Arbeit zugrunde liegenden Guaiacol-Oxidationsassay handelt es sich um einen relativ einfachen optischen Test zur photometrischen Bestimmung der Enzymaktivität. Allerdings sind aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit bei diesem Versuch ein sehr schnelles und genaues Arbeiten besonders beim Start der Reaktionen notwendig und Fehler hier nicht ausgeschlossen. Auch bei den anderen Arbeitsschritten (Proteinbestimmung, Herstellung der Stammlösungen, Pipettieren der einzelnen Volumina) sind Fehler sicherlich nicht auszuschließen, aber deutlich unwahrscheinlicher.

Letztendlich ist dieser einfache Test gut als Screening-Instrument für die Wirkung endokriner Disruptoren auf die TPO geeignet, beim Nachweis von Wirkungsmechanismen stößt er allerdings an seine Grenzen. Hierzu müsste man sicherlich die TPO weiter aufreinigen und mittels geeigneter Methoden auch eine TPO-Konzentrationsbestimmung und weitere spektrophotometrische Messungen durchführen.

Die für diese Arbeit gewonnenen Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt, an geeigneter Stelle wurden IC_{50} -Werte berechnet. Eine Signifikanzanalyse war aufgrund der geringen Anzahl der Einzelmesswerte nicht sinnvoll.

5.6. Welche Fragestellungen bleiben offen?

In dieser Arbeit wurde ein auf humaner rekombinanter TPO basierendes Messsystem etabliert, das zum in vitro Screening endokriner Disruptoren bezüglich ihrer Wirkung auf die humane TPO verwendet werden kann. Um in diesem System in großem Maß Stoffe screenen zu können, müsste es eventuell noch vereinfacht werden. Dies passiert aktuell in unserem Labor, wo Versuche im 96 well Mikrotiterplattenformat etabliert werden.

Um mit dem hier beschriebenen Messsystem in der Zukunft auch stöchiometrische Untersuchungen durchführen zu können, müssten die TPO-Extrakte weiter aufgereinigt und genauer charakterisiert werden (TPO-Konzentrationsbestimmung).

In dem in dieser Arbeit vorgestellten neuen Messsystem wurden die endokrinen Disruptoren Benzophenon 2, F21388, Genistein, Myricetin, Apigenin und Xanthohumol in einem Inhibierungsassay und die ersten vier genannten Stoffe auch in einem Inaktivierungsassay auf ihren Effekt auf die TPO untersucht.

Hier zeigte sich, dass Benzophenon 2, F21388 und Genistein die TPO irreversibel inaktivieren, während es durch Myricetin zu einer reversiblen Hemmung kommt. Die irreversible Inaktivierung der TPO kann dabei durch Iodid verhindert werden. Für den genauen Ablauf der Hemmung, Inaktivierung und Iodidprotektion gibt es für Genistein bereits ein Modell, für die anderen Stoffe steht der Nachweis des Wirkungsmechanismus allerdings noch aus.

Eine letzte wichtige Frage ist, ob die beschriebenen in vitro Effekte auch in vivo und dabei insbesondere beim Menschen eine Rolle spielen. Für alle untersuchten endokrinen Disruptoren gibt es allerdings bisher noch keine Daten darüber, ob sie sich in der menschlichen Schilddrüse anreichern und wenn ja, ob die dabei erreichten Konzentrationen im Bereich der in dieser Arbeit beschriebenen IC_{50} -Werte liegen.

6. Zusammenfassung

Endokrine Disruptoren sind Stoffe, die die Entwicklung oder die Funktion des Hormonsystems stören oder verändern. Dabei kann es sich sowohl um synthetische Chemikalien als auch um natürliche Pflanzenprodukte wie die Flavonoide handeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie 6 unterschiedliche Stoffe (die Flavonoide Apigenin, Genistein, Myricetin und Xanthohumol, das synthetische Flavonoid F21388 und der in Kosmetika enthaltene UV-Filter Benzophenon 2) auf die humane TPO, eines der Schlüsselenzyme in der Schilddrüsenhormonsynthese, wirken. Dazu wurde ein neuer in vitro Assay etabliert, der auf Extrakten aus stabil mit humaner TPO transfizierten FTC-238 Zellen beruht. Diese Extrakte zeigten im Vergleich mit Extrakten, die aus humanen Strumaproben gewonnen wurden, vergleichbare Eigenschaften bezüglich Proteinkonzentration, spezifischer Aktivität und Hemmbarkeit durch Benzophenon 2 und lieferten dabei Werte mit einer geringeren Streubreite. Aus diesem Grund erscheint dieser neue Assay gut als Screening-Verfahren geeignet, um Inhibitoraten zu gewinnen, die Relevanz für die menschliche TPO und damit für die menschliche Gesundheit haben. Dieses in vitro Screening wäre der erste Schritt, bevor ausgewählte potentiell schädliche Stoffe mit aufwendigeren Verfahren (zum Beispiel Tierversuche, Verzehrstudien oder epidemiologischen Studien) untersucht werden.

Mit den beschriebenen Extrakten wurden die oben genannten Stoffe zunächst im Guaiacol-Oxidationsassay untersucht, wobei Apigenin und Xanthohumol keinen ausgeprägten Effekt zeigten. Als potente Hemmstoffe der TPO erwiesen sich Genistein, F21388 und Benzophenon 2 mit IC_{50} -Werten von 50,6 μ M, 37,5 μ M beziehungsweise 513 nM. Auch Myricetin hemmte die TPO in höheren Konzentrationen, interagierte aber im Konzentrationsbereich von 5 bis 30 μ M in einer Art mit der TPO, dass keine verwertbaren Kurven entstanden. Die Ursache hierfür bleibt unklar.

Anschließend wurden die 4 Stoffe, die die TPO im Guaiacol-Oxidationsassay hemmten, im TPO-Inaktivierungsassay untersucht. Dazu wurden Genistein, F21388, Benzophenon 2 und Myricetin in Anwesenheit von H_2O_2 mit der TPO inkubiert und nach bestimmten Zeiten die TPO-Aktivität im Guaiacol-Oxidationsassay bestimmt. Dabei zeigte Myricetin nur eine geringe Wirkung, während die anderen Stoffe die TPO konzentrationsabhängig inaktivierten. Benzophenon 2 erwies sich auch hier als deutlich potenter als Genistein und F21388. Die Inaktivierung der TPO durch die endokrinen

Disruptoren konnte durch die Zugabe vom 200 μM Kaliumiodid zum Inkubationsansatz nahezu vollständig verhindert werden. Unter physiologischen Bedingungen könnte der schützende Effekt von Iodid besonders in Iodmangelgebieten eine Rolle spielen, wo sich dadurch die mögliche Störung der Schilddrüsenhormonsynthese durch die endokrinen Disruptoren noch verstärken könnte.

Trotz einzelner Studien mit Nagetieren, in denen sich Hinweise ergaben, dass die hier beschriebenen *in vitro* Effekte auch *in vivo* eine Rolle spielen, und einiger Befunde beim Menschen, steht der klare Nachweis der pathogenen Wirkung der untersuchten endokrinen Disruptoren auf die Schilddrüsenhormonachse des Menschen noch aus.

7. Literaturverzeichnis

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 1987;262(12):5592-5

Albini A, Dell'Eva R, Vene R, et al. Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF-kappaB and Akt as targets. *FASEB J.* 2006;20(3):527-9

Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* 1995;333(5):276-82

Anthony MS, Clarkson TB, Bullock BC, Wagner JD. Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):2524-31

Baker JR, Arscott P, Johnson J. An analysis of the structure and antigenicity of different forms of human thyroid peroxidase. *Thyroid.* 1994;4(2):173-8

Banga JP, Mahadevan D, Barton GJ, et al. Prediction of domain organisation and secondary structure of thyroid peroxidase, a human autoantigen involved in destructive thyroiditis. *FEBS Lett.* 1990;266(1-2):133-41

Basile A, Sorbo S, Giordano S, et al. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia.* 2000;71 Suppl 1:S110-6

Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1191–1201

Bikker H, Baas F, De Vijlder JJ. Molecular analysis of mutated thyroid peroxidase detected in patients with total iodide organification defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(2):649-53

Bitto A, Polito F, Atteritano M et al. Genistein aglycone does not affect thyroid function: results from a three-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3067–3072

Boege F, Straub T, Kehr A, et al. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J Biol Chem*. 1996;271(4):2262-70

Bresson D, Rebuffat SA, Peraldi-Roux S Localization of the immunodominant region on human thyroid peroxidase in autoimmune thyroid diseases: an update. *J Autoimmune Dis*. 2005;2(1):2-9

Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, et al. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in arabidopsis. *Plant Physiol*. 2001;126(2):524-35

Capeillère-Blandin C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. *Biochem J*. 1998;336 (Pt 2):395-404

Carroll DG. Nonhormonal therapies for hot flashes in menopause. *Am Fam Physician*. 2006;73(3):457-64

Carvalho DP, Dupuy C, Gorin Y et al. The Ca²⁺- and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent hydrogen peroxide generating system is induced by thyrotropin in porcine thyroid cells. *Endocrinology*. 1996;137(3):1007-12

Carvalho DP, Ferreira AC, Coelho SM, Moraes JM, Camacho MA, Rosenthal D Thyroid peroxidase activity is inhibited by amino acids. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33(3):355-61

Chambard M, Verrier B, Gabrion J, Mauchamp J Polarization of Thyroid Cells in Culture: Evidence for the Basolateral Localization of the Iodide "Pump" and of the Thyroid-stimulating Hormone Receptor-Adenyl Cyclase Complex. *J Cell Biol*. 1983;96(4):1172-7

Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr.* 2000;130(8):1963-70

Chang HC, Doerge DR. Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;168(3):244-52

Chen A, Rogan WJ. Isoflavones in soy infant formula: a review of evidence for endocrine and other activity in infants. *Annu. Rev. Nutr.* 2004;24:33–54

Choi C, Cho H, Park J, Cho C, Song Y. Suppressive effects of genistein on oxidative stress and NFkappaB activation in RAW 264.7 macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67(9):1916-22

Choi JS, Choi YJ, Park SH, Kang JS, Kang YH. Flavones mitigate tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor-kappa B. *J Nutr.* 2004;134(5):1013-9

Cimafranca MA, Davila J, Ekman GC et al. Acute and chronic effects of oral genistein administration in neonatal mice. *Biol Reprod.* 2010;83(1):114-21

Cook MR, Luo J, Ndiaye M, Chen H, Kunnimalaiyaan M. Xanthohumol inhibits the neuroendocrine transcription factor achaete-scute complex-like 1, suppresses proliferation, and induces phosphorylated ERK1/2 in medullary thyroid cancer. *Am J Surg.* 2010;199(3):315–318

Cook NC, Samman S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 1996;7(2):66-76

Corvilain B, van Sande J, Laurent E, Dumont JE. The H₂O₂-generating system modulates protein iodination and the activity of the pentose phosphate pathway in dog thyroid. *Endocrinology.* 1991;128(2):779-85

Coval ML, Taurog A. Purification and iodinating activity of hog thyroid peroxidase. *J Biol Chem.* 1967;242(23):5510-23

De Deken X, Wang D, Many MC, et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem.* 2000;275(30):23227-33

Delclos KB, Bucci TJ, Lomax LG, et al. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod Toxicol.* 2001;15(6):647-63

Dillingham BL, McVeigh BL, Lampe JW, Duncan AM. Soy protein isolates of varied isoflavone content do not influence serum thyroid hormones in healthy young men. *Thyroid.* 2007;17(2):131-7

Divi RL, Chang HC, Doerge DR. Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochem Pharmacol.* 1997;54(10):1087-96

Divi RL, Doerge DR. Mechanism-based inactivation of lactoperoxidase and thyroid peroxidase by resorcinol derivatives. *Biochemistry.* 1994;33(32):9668-74

Divi RL, Doerge DR. Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem Res Toxicol.* 1996;9(1):16-23

Dixon RA, Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry.* 2002;60(3):205-11

Doerge DR, Chang HC. Inactivation of thyroid peroxidase by soy isoflavones, in vitro and in vivo. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;777(1-2):269-79

Doerge DR, Divi RL, Churchwell MI. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Anal Biochem.* 1997;250(1):10-7

Doerge DR, Taurog A, Dorris ML. Evidence for a radical mechanism in peroxidase-catalyzed coupling. II. Single turnover experiments with horseradish peroxidase. Arch Biochem Biophys. 1994;315(1):90-9

Doerge DR, Twaddle NC, Churchwell MI, Newbold RR, Delclos KB. Lactational transfer of the soy isoflavone, genistein, in Sprague-Dawley rats consuming dietary genistein. Reprod Toxicol. 2006;21(3):307-12

Dohan O, de la Vieja A, Paroder V, et al. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance. Endocr Rev. 2003;24:48–77

Duncan AM, Underhill KE, Xu X, Lavalleur J, Phipps WR, Kurzer MS. Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84(10):3479-84

Dunn JT, Dunn AD. Thyroglobulin: chemistry, biosynthesis, and proteolysis. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. 8th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:91-104

Dunn JT, Dunn AD. Update on intrathyroidal iodine metabolism. Thyroid. 2001;11(5):407-14

El Hassani RA, Benfares N, Caillou B, et al. Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005;288(5):G933-42

Endocrine Disruption: The problem (aufgerufen am 03.06.06 unter <http://www.credocluster.info/edproblem.html>)

Engler H, Riesen WF, Keller B. Anti-thyroid peroxidase (anti-TPO) antibodies in thyroid diseases, non-thyroidal illness and controls. Clinical validity of a new commercial method for detection of anti-TPO (thyroid microsomal) autoantibodies. Clin Chim Acta. 1994;225(2):123-36

Engler H, Taurog A, Dorris ML. Preferential inhibition of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine formation by propylthiouracil and methylmercaptoimidazole in thyroid peroxidase-catalyzed iodination of thyroglobulin. *Endocrinology*. 1982;110(1):190-7

Eskandari S, Loo DDF, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem*. 1997;272(43):27230-8

Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, Franc JL. Human thyroperoxidase is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking. *Endocrinology*. 1998;139(10):4277-85

Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, Franc JL. Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H₂O₂ generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding. *J Biol Chem*. 1999;274(15):10533-8

Fayadat L, Siffroi-Fernandez S, Lanet J, Franc JL. Degradation of human thyroperoxidase in the endoplasmic reticulum involves two different pathways depending on the folding state of the protein. *J Biol Chem*. 2000;275(21):15948-54

Fenna R, Zeng J, Davey C. Structure of the green heme in myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316(1):653-6

Ferrand M, Le Fourn V, Franc JL. Increasing diversity of human thyroperoxidase generated by alternative splicing. Characterized by molecular cloning of new transcripts with single- and multispliced mRNAs. *J Biol Chem*. 2003;278(6):3793-800

Ferreira AC, Lisboa PC, Oliveira KJ, Lima LP, Barros IA, Carvalho DP. Inhibition of thyroid type 1 deiodinase activity by flavonoids. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(7):913-7

Ferreira AC, Rosenthal D, Carvalho DP. Thyroid peroxidase inhibition by *Kalanchoe brasiliensis* aqueous extract. *Food Chem Toxicol*. 2000;38(5):417-21

Foti D, Kaufman KD, Chazenbalk GD, Rapoport B. Generation of a biologically active, secreted form of human thyroid peroxidase by site-directed mutagenesis. *Mol Endocrinol.* 1990;4(5):786-91

Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, et al. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(7):2690-4

Gardas A, Sohi MK, Sutton BJ, McGregor AM, Banga JP. Purification and crystallisation of the autoantigen thyroid peroxidase from human Graves' thyroid tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;234(2):366-70

Gardas A, Sutton BJ, Piotrowska U, et al. Distinct immunological and biochemical properties of thyroid peroxidase purified from human thyroid glands and recombinant protein produced in insect cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1433(1-2):229-39

Gavaret JM, Cahnmann HJ, Nunez J. Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. The mechanism of the coupling reaction. *J Biol Chem.* 1981;256(17):9167-73

Gavaret JM, Nunez J, Cahnmann HJ. Formation of dehydroalanine residues during thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. *J Biol Chem.* 1980;255(11):5281-5

Gerhauser C. Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49(9):827-31

Gerhauser C, Alt A, Heiss E, et al. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(11):959-69

Gimenez-Arnau A, Gimenez-Arnau E, Serra-Baldrich E, Lepoittevin JP, Camarasa JG. Principles and methodology for identification of fragrance allergens in consumer products. *Contact Dermatitis.* 2002;47(6):345-52

Gonzales H, Farbroth A, Larko O, Wennberg AM. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. *Br J Dermatol.* 2006;154(2):337-40

Gradolatto A, Basly JP, Berges R, et al. Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(1):49-54

Griffiths LA, Smith GE. Metabolism of myricetin and related compounds in the rat. Metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro. *Biochem J.* 1972;130(1):141-51

Gu Y, Zhu CF, Dai YL, Zhong Q, Sun B. Inhibitory effects of genistein on metastasis of human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2009;15(39):4952-7

Guo J, McLachlan SM, Hutchison S, Rapoport B. The greater glycan content of recombinant human thyroid peroxidase of mammalian than of insect cell origin facilitates purification to homogeneity of enzymatically protein remaining soluble at high concentration. *Endocrinology.* 1998;139(3):999-1005

Gut P, Grennan Jones F, Sullivan A et al. Recombinant human thyroid peroxidase produced in insect cells has similar properties to native human thyroid peroxidase. *Thyroid.* 2000;10(7):543-50

Haem peroxidases (aufgerufen am 10.03.06 unter <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/PEROXIDASES.html>)

Hakkinen SH, Karenlampi SO, Heinonen IM, Mykkanen HM, Torronen AR. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem.* 1999;47(6):2274-9

Hamilton-Reeves JM, Vazquez G, Duval SJ et al. Clinical studies show no effects of soy protein or isoflavones on reproductive hormones in men: results of a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2010;94(3):997-1007

HAMPL R, OSTATNIKOVA D, CELEC P, PUTZ Z, LAPCÍK O, MATUCHA P. Short-term effect of soy consumption on thyroid hormone levels and correlation with phytoestrogen level in healthy subjects. *Endocr Regul*. 2008;42(2-3):53-61

HANY J, NAGEL R. Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Muttermilch. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 1995;91(11):341-345

HARBORNE JB, WILLIAMS CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000;55(6):481-504

HARRIS DM, BESSELINK E, HENNING SM, GO VL, HEBER D. Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or Beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005;230(8):558-68

HENDRY E, TAYLOR G, ZIEMNICKA K, et al. Recombinant human thyroid peroxidase expressed in insect cells is soluble at high concentrations and forms diffracting crystals. *J Endocrinol*. 1999;160(3):R13-5

HERZOG V, BERNDORFER U, SABER Y. Isolation of insoluble secretory product from bovine thyroid: extracellular storage of thyroglobulin in covalently cross-linked form. *J Cell Biol*. 1992;118(5):1071-83

HIREMATH SP, BADAMI S, HUNASAGATTA SK, PATIL SB. Antifertility and hormonal properties of flavones of *Striga orobanchioides*. *Eur J Pharmacol*. 2000;391(1-2):193-7

HOBBY P, GARDAS A, RADOMSKI R, MCGREGOR AM, BANGA JP, SUTTON BJ. Identification of an immunodominant region recognized by human autoantibodies in a three-dimensional model of thyroid peroxidase. *Endocrinology*. 2000;141(6):2018-26

Hosoya T, Kondo Y, Ui N. Peroxidase activity in thyroid gland and partial purification of the enzyme. *J Biochem.* 1962;52:180-9

Hosoya T, Sato I, Hiyama Y, Yoshimura H, Niimi H, Tarutani O. An improved assay method for thyroid peroxidase applicable for a few milligrams of abnormal human thyroid tissues. *J Biochem.* 1985;98(3):637-47

Hu M, Chen J, Lin H. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: mechanistic studies of disposition of apigenin in the Caco-2 cell culture model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307(1):314-21

Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, et al. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology.* 1999;140(4):1893-900

Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, et al. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(2):255-62

Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Koch L, Wuttke W. Multi-organic endocrine disrupting activity of the UV screen benzophenone 2 (BP2) in ovariectomized adult rats after 5 days treatment. *Toxicology.* 2004;205(1-2):87-93

Jefferson WN, Doerge D, Padilla-Banks E et al. Oral exposure to genistin, the glycosylated form of genistein, during neonatal life adversely affects the female reproductive system. *Environ Health Perspect.* 2009;117(12):1883-9

Jimenez R, Andriambeloson E, Duarte J, et al. Involvement of thromboxane A2 in the endothelium-dependent contractions induced by myricetin in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol.* 1999;127(7):1539-44

Kadry AM, Okereke CS, Abdel-Rahman MS, Friedman MA, Davis RA. Pharmacokinetics of benzophenone-3 after oral exposure in male rats. *J Appl Toxicol.* 1995;15(2):97-102

Kang HJ, Youn YK, Hong MK, Kim LS. Antiproliferation and redifferentiation in thyroid cancer cell lines by polyphenol phytochemicals. *J Korean Med Sci* 2011;26:893-899

Kaplotis S, Hermann M, Held I, Seelos C, Ehringer H, Gmeiner BM. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):2868-74

Kaufman KD, Rapoport B, Seto P, Chazenbalk GD, Magnusson RP. Generation of recombinant, enzymatically active human thyroid peroxidase and its recognition by antibodies in the sera of patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Invest.* 1989;84(2):394-403

Kempuraj D, Madhappan B, Christodoulou S, et al. Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. *Br J Pharmacol.* 2005;145(7):934-44

Kimura S, Hong YS, Kotani T, Ohtaki S, Kikkawa F. Structure of the human thyroid peroxidase gene: comparison and relationship to the human myeloperoxidase gene. *Biochemistry.* 1989;28(10):4481-9

Kimura S, Kotani T, McBride OW, et al. Human thyroid peroxidase: Complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(16):5555-9

Kimura S, Kotani T, Ohtaki S, Aoyama T. cDNA-directed expression of human thyroid peroxidase. *FEBS Lett.* 1989;250(2):377-80

Kimura S, Suwa J, Ito M, Sato H. Development of malignant goiter by defatted soybean with iodine-free diet in rats. *Gann*. 1976;67(5):763-5

Köhrle J. Environment and endocrinology: The case of thyroidology. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2008;69(2):116-22

Köhrle J, Fang SL, Yang Y et al. Rapid effects of the flavonoid EMD 21388 on serum thyroid hormone binding and thyrotropin regulation in the rat. *Endocrinology*. 1989;125(1):532-7

Konde M, Ingenbleek Y, Daffe M, Sylla B, Barry O, Diallo S. Goitrous endemic in Guinea. *Lancet*. 1994;344(8938):1675-8

Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep*. 2005;57(3):390-4

Krinsky MM, Alexander NM. Thyroid peroxidase. Nature of the heme binding to apoperoxidase. *J Biol Chem*. 1971;246(15):4755-8

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998;139(10):4252-63

Kunz PY, Galicia HF, Fent K. Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicol Sci*. 2006;90(2):349-61

Kwak HS, Park SY, Kim MG et al. Marked individual variation in isoflavone metabolism after a soy challenge can modulate the skeletal effect of isoflavones in premenopausal women. *J Korean Med Sci*. 2009;24(5):867-73

Lamartiniere CA, Cotroneo MS, Fritz WA, Wang J, Mentor-Marcel R, Elgavish A. Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr*. 2002;132(3):552S-558S

Lamas L, Taurog A, Salvatore G, Edelhoeh H. Preferential synthesis of thyroxine from early iodinated tyrosyl residues in thyroglobulin. *J Biol Chem.* 1974;249(9):2732-7

Lee MM, Gomez SL, Chang JS, Wey M, Wang RT, Hsing AW. Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(7):665-8

Li Y, Upadhyay S, Bhuiyan M, Sarkar FH. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene.* 1999;18(20):3166-72

Lueprasitsakul W, Alex S, Fang SL, et al. Flavonoid administration immediately displaces thyroxine (T4) from serum transthyretin, increases serum free T4, and decreases serum thyrotropin in the rat. *Endocrinology.* 1990;126(6):2890-5

Maggiolini M, Recchia AG, Bonofiglio D, et al. The red wine phenolics piceatannol and myricetin act as agonists for estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *J Mol Endocrinol.* 2005;35(2):269-81

Magnusson RP, Gestautas J, Taurog A, Rapoport B. Molecular cloning of the structural gene for porcine thyroid peroxidase. *J Biol Chem.* 1987;262(29):13885-8

Magnusson RP, Taurog A, Dorris ML. Mechanism of iodide-dependent catalytic activity of thyroid peroxidase and lactoperoxidase. *J Biol Chem.* 1984;259(1):197-205

Makela S, Savolainen H, Aavik E, et al. Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):7077-82

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):727-47

Markovits J, Linassier C, Fosse P, et al. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* 1989;49(18):5111-7

Marrig C, Lejeune PJ, Venot N, Vinet L. Hormone synthesis in human thyroglobulin: possible cleavage of the polypeptide chain at the tyrosine donor site. *FEBS Lett.* 1989;242(2):414-8

Matsumoto H, Adachi S, Suzuki Y. Estrogenic activity of ultraviolet absorbers and the related compounds. *Yakugaku Zasshi.* 2005;125(8):643-52

McDonald DO, Pearce SH. Thyroid peroxidase forms thionamide-sensitive homodimers: relevance for immunomodulation of thyroid autoimmunity. *J Mol Med.* 2009;87:971–980

McLachlan SM, Rapoport B. Thyroid peroxidase as an autoantigen. *Thyroid.* 2007;17(10):939-48

Medeiros-Neto G, Gil-Da-Costa MJ, Santos CL, et al. Metastatic thyroid carcinoma arising from congenital goiter due to mutation in the thyroperoxidase gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(11):4162-6

Meyer H, Bolarinwa A, Wolfram G, Linseisen J. Bioavailability of apigenin from apiin-rich parsley in humans. *Ann Nutr Metab.* 2006;50(3):167-72

Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem.* 2001;49(6):3106-12

Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(6):2249-52

Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol.* 1999;37(4):271-85

Miranda CL, Stevens JF, Ivanov V, et al. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. *J Agric Food Chem.* 2000;48(9):3876-84

Miranda CL, Yang YH, Henderson MC, et al. Prenylflavonoids from hops inhibit the metabolic activation of the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, mediated by cDNA-expressed human CYP1A2. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(11):1297-302

Miyazawa M, Hisama M. Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67(10):2091-9

Monteiro R, Becker H, Azevedo I, Calhau C. Effect of hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids on aromatase (estrogen synthase) activity. *J Agric Food Chem.* 2006;54(8):2938-43

Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, et al. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res.* 2002;17(10):1904-12

Mori K, Stone S, Braverman LE, Devito WJ. Involvement of tyrosine phosphorylation in the regulation of 5'-deiodinases in FRTL-5 rat thyroid cells and rat astrocytes. *Endocrinology.* 1996;137(4):1313-8

Moura EG, Rosenthal D, Carvalho-Guimarães DP. Thyroid peroxidase activity in human nodular goiters. *Braz J Med Biol Res.* 1989;22(1):31-9

Nagata C, Takatsuka N, Inaba S, Kawakami N, Shimizu H. Effect of soymilk consumption on serum estrogen concentrations in premenopausal Japanese women. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(23):1830-5

Nagtegaal M, Ternes T, Baumann W, Nagel R. UV-Filtersubstanzen in Wasser und Fischen. *Z Umweltchem Ökotox* 1997;9:79-86

Nakamura H, Wang Y, Kurita T, Adomat H, Cunha GR, Wang Y. Genistein increases epidermal growth factor receptor signaling and promotes tumor progression in advanced human prostate cancer. *PLoS One*. 2011;6(5):e20034

Nakamura M, Yamazaki I, Kotani T, Ohtaki S. Thyroid peroxidase selects the mechanism of either 1- or 2-electron oxidation of phenols, depending on their substituents. *J Biol Chem*. 1985;260(25):13546-52

Nakashima T, Taurog A, Riesco G. Mechanism of action of thioureylene antithyroid drugs: factors affecting intrathyroidal metabolism of propylthiouracil and methimazole in rats. *Endocrinology*. 1978;103(6):2187-97

Nakashima T, Taurog A. Rapid conversion of carbimazole to methimazole in serum; evidence for an enzymatic mechanism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1979;10(6):637-48

Nejaty H, Lacey M, Whitehead SA. Differing effects of endocrine-disrupting chemicals on basal and FSH-stimulated progesterone production in rat granulosa-luteal cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(6):570-6

Nestel PJ, Yamashita T, Sasahara T, et al. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(12):3392-8

Niccoli P, Fayadat L, Panneels V, Lanet J, Franc JL. Human thyroperoxidase in its alternatively spliced form (TPO2) is enzymatically inactive and exhibits changes in intracellular processing and trafficking. *J Biol Chem*. 1997;272(47):29487-92

Niccoli-Sire P, Fayadat L, Siffroi-Fernandez S, Malthierry Y, Franc JL. Alternatively spliced form of human thyroperoxidase, TPOzanelli: activity, intracellular trafficking, and role in hormonogenesis. *Biochemistry*. 2001;40(8):2572-9

Ohtaki S, Kotani T, Nakamura Y. Characterization of human thyroid peroxidase purified by monoclonal antibody-assisted chromatography. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;63(3):570-6.

Ohtaki S, Nakagawa H, Kimura S, Yamazaki I. Analyses of catalytic intermediates of hog thyroid peroxidase during its iodinating reaction. *J Biol Chem.* 1981;256(2):805-10

Ohtaki S, Nakagawa H, Nakamura M, Yamazaki I. Reactions of purified hog thyroid peroxidase with H₂O₂, tyrosine, and methylmercaptoimidazole (goitrogen) in comparison with bovine lactoperoxidase. *J Biol Chem.* 1982;257(2):761-6

Ohtaki S, Nakagawa H, Nakamura S, Nakamura M, Yamazaki I. Characterization of hog thyroid peroxidase. *J Biol Chem.* 1985;260(1):441-8

Okereke CS, Abdel-Rhman MS, Friedman MA. Disposition of benzophenone-3 after dermal administration in male rats. *Toxicol Lett.* 1994;73(2):113-22

Ong KC, Khoo HE. Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol.* 1997;29(2):121-6

Onozawa M, Fukuda K, Ohtani M, Akaza H, Sugimura T, Wakabayashi K. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Jpn J Clin Oncol.* 1998;28(6):360-3

Park SM, Chatterjee VK. Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet.* 2005;42(5):379-89

Pedraza P, Calvo R, Obregon MJ, Asuncion M, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar GM. Displacement of T₄ from transthyretin by the synthetic flavonoid EMD 21388 results in increased production of T₃ from T₄ in rat dams and fetuses. *Endocrinology.* 1996;137(11):4902-14

Peeters PH, Keinan-Boker L, van der Schouw YT, Grobbee DE. Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;77(2):171-83

Penel C, Gruffat D, Alquier C, Benoliel AM, Chabaud O. Thyrotropin chronically regulates the pool of thyroperoxidase and its intracellular distribution: a quantitative confocal microscopic study. *J Cell Physiol.* 1998;174(2):160-9

Peterson G, Barnes S. Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* 1996;7(10):1345-51

Possemiers S, Bolca S, Grootaert C, et al. The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. *J Nutr.* 2006;136(7):1862-7

Radović B, Hussong R, Gerhäuser C et al. Xanthohumol, a prenylated chalcone from hops, modulates hepatic expression of genes involved in thyroid hormone distribution and metabolism. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54 Suppl 2:S225-35

Radovic B, Mentrup B, Köhrle J. Genistein and other soya isoflavones are potent ligands for transthyretin in serum and cerebrospinal fluid. *Br J Nutr.* 2006;95(6):1171-6

Radovic B, Schmutzler C, Köhrle J. Xanthohumol stimulates iodide uptake in rat thyroid-derived FRTL-5 cells. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49(9):832-6

Rae TD, Goff HM. The heme prosthetic group of lactoperoxidase. Structural characteristics of heme I and heme I-peptides. *J Biol Chem.* 1998;273(43):27968-77

Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:17-38

Rodrigues C, Jorge P, Soares JP, et al. Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(2):193-8

Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 2002;22:19–34

Ruf J, Carayon P. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2006;445(2):269-77

Sartelet H, Serghat S, Lobstein A, et al. Flavonoids extracted from fonio millet (*Digitaria exilis*) reveal potent antithyroid properties. *Nutrition.* 1996;12(2):100-6

Sathyapalan T, Manuchehri AM, Thatcher NJ et al. The effect of soy phytoestrogen supplementation on thyroid status and cardiovascular risk markers in patients with subclinical hypothyroidism: a randomized, double-blind, crossover study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(5):1442-9

Sato Y, Suzaki S, Nishikawa T, Kihara M, Shibata H, Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 2000;72(3):483-8

Schlecht C, Klammer H, Frauendorf H, Wuttke W, Jarry H. Pharmacokinetics and metabolism of benzophenone 2 in the rat. *Toxicology.* 2008;245(1-2):11-7

Schlecht C, Klammer H, Jarry H, Wuttke W. Effects of estradiol, benzophenone-2 and benzophenone-3 on the expression pattern of the estrogen receptors (ER) alpha and beta, the estrogen receptor-related receptor 1 (ERR1) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats. *Toxicology.* 2004;205(1-2):123-30

Schmutzler C, Bacinski A, Gotthardt I et al. The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid. *Endocrinology.* 2007;148(6):2835-44

Schoene NW, Guidry CA. Dietary soy isoflavones inhibit activation of rat platelets. *J Nutr Biochem.* 1999;10(7):421-6

Schröder-van der Elst JP, van der Heide D, Köhrle J. In vivo effects of flavonoid EMD 21388 on thyroid hormone secretion and metabolism in rats. *Am J Physiol.* 1991;261(2 Pt 1):E227-32

Schröder-van der Elst JP, van der Heide D, Rokos H, Köhrle J, Morreale de Escobar G. Different tissue distribution, elimination, and kinetics of thyroxine and its conformational analog, the synthetic flavonoid EMD 49209 in the rat. *Endocrinology.* 1997;138(1):79-84

Schröder-van der Elst JP, van der Heide D, Romijn JA, Smit JW. Differential effects of natural flavonoids on growth and iodide content in a human Na⁺/I⁻ symporter-transfected follicular thyroid carcinoma cell line. *Eur J Endocrinol.* 2004;150(4):557-64

Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W. Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone. *Toxicology.* 2004;205(1-2):103-12

Setchell KD, Lydeking-Olsen. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(3 Suppl):593S-609S

Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr* 1998;68(suppl):1453S–61S

Shu XO, Jin F, Dai Q, et al. Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(5):483-8

Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res.* 2010;27(6):962–978

Song Y, Driessens N, Costa M et al. Roles of hydrogen peroxide in thyroid physiology and disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(10):3764-73

Song Y, Ruf J, Lothaire P et al. Association of duoxes with thyroid peroxidase and its regulation in thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(1):375-82

Spanka M, Hesch RD, Imscher K, Köhrle J. 5'-Deiodination in rat hepatocytes: effects of specific flavonoid inhibitors. *Endocrinology.* 1990;126(3):1660-7

Stevens JF, Page JE. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry.* 2004;65(10):1317-30

Strobel P, Allard C, Perez-Acle T, Calderon R, Aldunate R, Leighton F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochem J.* 2005;386(Pt 3):471-8

Sun W, Dunford HB. Kinetics and mechanism of the peroxidase-catalyzed iodination of tyrosine. *Biochemistry.* 1993;32(5):1324-31

Takayama S, Aihara K, Onodera T, Akimoto T. Antithyroid effects of propylthiouracil and sulfamonomethoxine in rats and monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1986;82(2):191-9

Taurog A. The mechanism of action of the thioureylene antithyroid drugs. *Endocrinology.* 1976;98(4):1031-46

Taurog A. Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text.* 7th ed. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 47-81

Taurog A. Molecular evolution of thyroid peroxidase. *Biochimie.* 1999;81(5):557-62

Taurog AM. Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. 8th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 61-85

Taurog A, Dorris ML. A reexamination of the proposed inactivation of thyroid peroxidase in the rat thyroid by propylthiouracil. *Endocrinology*. 1989;124(6):3038-42

Taurog A, Dorris M, Doerge DR. Evidence for a radical mechanism in peroxidase-catalyzed coupling. I. Steady-state experiments with various peroxidases. *Arch Biochem Biophys*. 1994;315(1):82-9

Taurog A, Dorris ML, Doerge DR. Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys*. 1996;330(1):24-32

Taurog A, Dorris ML, Guziec FSJ. Metabolism of ³⁵S- and ¹⁴C-labeled 1-methyl-2-mercaptoimidazole in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 1989;124(1):30-9

Taurog A, Dorris ML, Guziec LJ, Guziec FSJ. The selenium analog of methimazole. Measurement of its inhibitory effect on type I 5'-deiodinase and of its antithyroid activity. *Biochem Pharmacol*. 1994;48(7):1447-53

Taurog A, Dorris ML, Hu WX, Guziec FSJ. The selenium analog of 6-propylthiouracil. Measurement of its inhibitory effect on type I iodothyronine deiodinase and of its antithyroid activity. *Biochem Pharmacol*. 1995;49(5):701-9

Taurog A, Wall M. Proximal and distal histidines in thyroid peroxidase: relation to the alternatively spliced form, TPO-2. *Thyroid*. 1998;8(2):185-91

Toppari J. Environmental endocrine disrupters and disorders of sexual differentiation. *Semin Reprod Med*. 2002;20(3):305-12

Van den Hove MF, Croizet-Berger K, Jouret F et al. The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. *Endocrinology*. 2006;147(3):1287-96

Varki A. Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol*. 1998;8(1):34-40

Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des europäischen Parlaments und des Rates (aufgerufen am 31.08.11 unter <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:396:0001:0851:DE:PDF>)

Virion A, Courtin F, Dème D, Michot JL, Kaniewski J, Pommier J. Spectral characteristics and catalytic properties of thyroid peroxidase-H₂O₂ compounds in the iodination and coupling reactions. *Arch Biochem Biophys*. 1985;242(1):41-7

Vuorinen H, Maatta K, Torronen R. Content of the flavonols myricetin, quercetin, and kaempferol in finnish berry wines. *J Agric Food Chem*. 2000;48(7):2675-80

Waring RH, Harris RM. Endocrine disrupters: a human risk? *Mol Cell Endocrinol*. 2005;244(1-2):2-9

Whitehead SA, Lacey M. Phytoestrogens inhibit aromatase but not 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 1 in human granulosa-luteal cells: evidence for FSH induction of 17beta-HSD. *Hum Reprod*. 2003;18(3):487-94

Wolff J, Halmi NS. Thyroidal iodide transport. V. The role of Na-K-activated, ouabain-sensitive adenosinetriphosphatase activity. *J Biol Chem*. 1963;238:847-51

Woodman OL, Chan ECH. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(11):786-90

Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol*. 2001;26(1):67-77

Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1097-142

Yokoyama N, Taurog A. Porcine thyroid peroxidase: relationship between the native enzyme and an active, highly purified tryptic fragment. *Mol Endocrinol.* 1988;2(9):838-44

Yoshida A, Hisatome I, Taniguchi S et al. Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin. *Endocrinology.* 2004;145(9):4301-8

Zand RS, Jenkins DJ, Diamandis EP. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;62(1):35-49

Zeng J, Fenna RE. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol.* 1992;226(1):185-207

Zhang X, Shu XO, Gao YT et al. Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women. *J Nutr.* 2003;133(9):2874-8

Zhao F, Nozawa H, Daikonnya A, Kondo K, Kitanaka S. Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus* L.). *Biol Pharm Bull.* 2003;26(1):61-5

Zoeller RT. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals? *Mol Cell Endocrinol.* 2005;242(1-2):10-5

8. Erklärung

„Ich, Anja Bacinski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Inhibitorische Wirkung endokriner Disruptoren auf die humane Thyreoperoxidase“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 01.08.2012

Anja Bacinski

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Publikationsliste

Schmutzler C, Bacinski A, Gotthardt I, Huhne K, Ambrugger P, Klammer H, Schlecht C, Hoang-Vu C, Grütters A, Wuttke W, Jarry H, Köhrle J. The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. *Endocrinology*. 2007;148(6):2835-44

Schmutzler C, Gotthardt I, Hofmann PJ, Radovic B, Kovacs G, Stemmler L, Nobis I, Bacinski A, Mentrup B, Ambrugger P, Grütters A, Malendowicz LK, Christoffel J, Jarry H, Seidlovà-Wuttke D, Wuttke W, Köhrle J. Endocrine disruptors and the thyroid gland - a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environ Health Perspect*. 2007;115 Suppl 1:77-83

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. Josef Köhrle für die Überlassung des Themas und die vielen guten Kommentare und Denkanstöße, die entscheidend zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Frau PD Dr. Cornelia Schmutzler möchte ich mich für die gute Betreuung während der praktischen Phase der Arbeit und erste Korrekturvorschläge bedanken.

Frau Katrin Huhne danke ich für die freundliche und geduldige Einarbeitung in die Zellkultur und die Enzymassays. Außerdem danke ich allen Institutsmitarbeitern für die stets freundliche und informative Zusammenarbeit.

Frau Dr. Petra Ambrugger vom Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie der Charité Berlin danke ich für die Überlassung der FTC-238/TPO Zellen, Herrn PD Dr. Cuong Hoang-Vu aus der Experimentellen und chirurgischen Onkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Strumaprobe, Herrn Professor Dr. Hans Becker vom Institut für Pharmakognosie und Analytische Phytochemie der Universität Saarbrücken für das Xanthohumol und Herrn Professor Dr. Peter Schreier vom Institut für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg für die Synthese des F21388.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann, der viel Zeit und Verständnis aufbringen musste, damit diese Arbeit vollendet werden konnte.